

Templatgeleitete Strukturbildung kollagenartiger Peptide

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Matthias Röber

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans G. Börner

2. Prof. Dr. Thomas Scheibel

3. Prof. Dr. Christian Hackenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2020

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans G. Börner am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Zeit von Januar 2014 bis Dezember 2017 angefertigt.

Kurzzusammenfassung

Die Nachahmung natürlichen Kollagens stellt aufgrund dessen einzigartiger Struktur erhöhte Anforderungen an die chemische und biochemische Synthese artifizierender kollagenartiger Peptide. In dieser Arbeit wurden Cystein-Knoten und Organo-Template als Konzepte zur Vororganisation vorgestellt, um Peptideinzelstränge in die Anordnung kollagenartiger Dreifachhelices (CTH) zu dirigieren. Zusätzlich wurden diese mit einem schaltbaren DEPSI Struktursegment zur Steuerung der Helixstruktur kombiniert. Die templatbasierte Strategie beruht auf einem dreiarmligen Gerüstmolekül, an welches drei Peptideinzelstränge mittels nativer chemischer Ligation geknüpft werden. Für das Cystein-Knoten-Konzept wurden kollagen-mimetische Peptide entwickelt. Diese bestehen aus einer Cystein-reichen Domäne (wc2-Domäne) und einem Abschnitt, der eine kollagenartige Sequenz von $[\text{Gly-Pro-Pro}]_x$ aufweist. Die Vororganisation, als auch der Schalterdefekt zeigten maßgebliche Auswirkungen bezüglich der Adaption der Peptide in kollagenartige Dreifachhelices, was mittels Langzeit-Equilibrierung und pH-Anstiegsexperimenten bestätigt werden konnte. Die synthetisch leichtere Zugänglichkeit des Cysteinknotensystems ermöglichte hingegen die Untersuchung von Positionseffekten der DEPSI Segmente. Abhängig von der Position modulieren die Schalterdefekte die wc2-Organisation, die Nukleierung und den CTH-Faltungsprozess. Die Cystein-Organisationsdomäne hatte den Vorteil, dass derartige Sequenzen ohne chemische Modifikation direkt im biotechnologischen Prozess in Unimere eingebracht werden konnten. Eine *E. coli*-basierte Produktionsstrategie, die im Arbeitskreis von Herrn Prof. Scheibel der Universität Bayreuth entwickelt wurde, ermöglichte den Zugang zu $[\text{GPP}]_{50}$ -Konstrukten, die ebenfalls die wc2-Domäne trugen. Weitere Untersuchungen wiesen zudem eine redox-reaktive Schaltbarkeit der Peptide nach. Um die Verwendbarkeit der synthetischen Kollagene als Biomaterial zu testen, wurde die Kompatibilität in zweidimensionalen Adhäsions- und Zytotoxizitätstests überprüft. Es stellte sich heraus, dass die Zelladhäsion für unmodifizierte Filme schwach ist. Dies lässt sich vermutlich auf den Mangel an Integrin-Bindestellen zurückführen und bietet somit eine hervorragende Eigenschaft für die Verwendung als Biomaterial, bei dem eine übermäßige Zellinteraktion nicht erwünscht ist. Die mangelnde Interaktion mit Zellen beruhte nicht auf toxischen Effekten, da die Einführung eines C-terminalen Zelladhäsionsmotivs an kurzen wc2- $[\text{GPP}]$ -Peptiden die Integrin-Adhäsion begünstigt und das zelluläre Wachstum nicht hemmt.

Abstract

Due to its unique structure, the imitation of natural collagen increased the demands on the chemical and biochemical synthesis of artificial collagen mimetic peptides (CMPs). In this thesis, concepts of cysteine knots and organo-templates were presented for the preorganization of peptide single strands into the arrangement of collagenous triple helices (CTHs). These techniques were additionally combined with a switchable DEPSI structure segment to further control the helix structure. The template-based strategy relies on a three-armed scaffold to which three peptide strands are attached by native chemical ligation. For the cysteine-knot concept, collagen mimetic peptides consisting of a cysteine-rich domain (wc2-domain) and a domain with a collagen-like sequence of $[\text{Gly-Pro-Pro}]_x$ were developed. The preorganization, as well as the switch defect, showed significant effects on the adaptation of the peptides in collagenous triple helices, which could be confirmed by long-term equilibration and pH-jump experiments. The synthetic ease of accessibility of the cysteine-knot system, on the other hand, allowed the study of the positioning effects of the DEPSI segments. Depending on the position, the switch defects modulate wc2-organization, nucleation and the CTH folding process. This cysteine organization domain had the advantage that such sequences could be introduced into unimers directly in the biotechnological process without chemical modification. An *E. coli*-based production strategy developed in the research group of Prof. Scheibel of the University of Bayreuth allowed access to $[\text{GPP}]_{50}$ constructs, which also carried the wc2-domain. Further investigations also showed a redox-reactive switchability of the peptides.

To examine the utility of the synthetic collagen as a biomaterial, compatibility was tested in two-dimensional adhesion and cytotoxicity tests. It turned out that cell adhesion is weak for unmodified films. This is believed to be due to the lack of integrin-binding sites and is an excellent property for use as a biomaterial in which excessive cell interaction is not desired. However, the lack of interaction with cells was not due to toxic effects as the introduction of a C-terminal cell adhesion motif on short wc2-[GPP] peptides favors integrin adhesion and does not inhibit cellular growth.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Zielstellung	1
2	Einführung und Grundlagen	3
2.1	Kollagen	3
2.1.1	Kollagen-Struktur	4
2.1.2	Kollagen in der Natur	8
2.2	Synthetisches Kollagen - kollagenartige Peptide	10
2.2.1	Selbstorganisationsstrategien	10
2.2.2	Selbstorganisation mittels nicht-kovalenter Wechselwirkung	11
2.2.3	Strukturbildung mittels Cys-Knoten	14
2.2.4	Templatstabilisierung	17
2.3	(An)Schaltung der Kollagen-Dreifachhelix	20
2.3.1	DEPSI-Peptide zur Steuerung der Peptidstruktur	21
2.4	Native chemische Ligation	23
3	Ergebnisse und Diskussion	25
3.1	Konzept	25
3.1.1	Organotemplat-Strategie	26
3.2	Native Chemische Ligation	28
3.2.1	Synthese des Templates der 1. Generation (TG ^{1st})	29
3.2.2	Optimierung der Ligationsbedingungen	30
3.2.3	Problematik der intramolekularen Nebenreaktion	34
3.2.4	NCL ohne exogene Thioladditive	35
3.2.5	Einfluss der Templatgröße	38
3.2.6	Vergleich der Template TG ^{1st} und TG ^{2nd}	40
3.3	pH-schaltbare Template	46
3.3.1	Schaltung der CMPs und Einfluss auf die CTH Bildung	46
3.3.2	pH-abhängige CD-Messungen	53

3.3.3	Temperaturabhängige CD-Messungen	54
3.4	Cystein-Oxidation als Präorganisationsprinzip	58
3.5	DEPSI-Lokalisation	59
3.5.1	Herstellung des Probensatzes und Überprüfung der DEPSI Integrität . . .	59
3.5.2	CD-Spektroskopie	65
3.5.3	Temperaturabhängige CD-Spektroskopie	67
3.5.4	pH-abhängige CD-Messungen	69
3.6	Einfluss der wc2-Domäne auf die Bildung der Kollagen-Dreifachhelix	71
3.6.1	Einfluss von Oxidation und Reduktion auf die wc2-Domäne	73
3.6.2	Grad der Oligomerisierung - Mehrwinkel-Lichtstreuung	76
3.6.3	Rasterkraftmikroskopie	78
3.6.4	Zellkulturversuche	80
4	Zusammenfassung und Ausblick	83
5	Experimenteller Teil	87
5.1	Chemikalien und Lösungsmittel	87
5.2	Methoden	88
5.2.1	Peptidcharakterisierung	88
5.2.2	Circulardichroismus Spektroskopie	89
5.2.3	SEC-MALS	89
5.2.4	Atomkraftmikroskopie	90
5.2.5	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie	90
5.2.6	Zellkultur	90
5.2.7	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)	91
5.3	Synthese	91
5.3.1	Allgemeine Peptidsynthese	91
5.3.2	Freisetzung der Peptide	92
5.3.3	Peptidaufreinigung	92
5.3.4	Klonierung und biotechnologische Proteinproduktion	93
5.3.5	Synthese von TREN-(suc-Peptid) ₃	94

5.3.6	Synthese des Schaltsegmentes -Gly(Boc)Ser-	94
5.3.7	Boc-Entschützung der Schaltsegmente -Gly(Boc)Ser-	95
5.4	Synthese der NCL-Template	96
5.4.1	Synthese des NCL-Templats der ersten Generation TG ^{1st}	96
5.4.2	Synthese des NCL-Templats der zweiten Generation TG ^{2nd}	99
5.4.3	Synthese von TREN-(suc-[GPP] _{1/3/7}) ₃	104
5.5	Peptide für die Templatstrategie	105
5.5.1	Synthese von Cys-[Gly-Pro-Pro] ₇	105
5.5.2	Synthese von Cys-Pro-Pro-[Gly-Pro-Pro] ₄	106
5.5.3	Synthese von CMP ^(-T-S)	107
5.5.4	Synthese von CMP ^(-T+S)	108
5.6	Synthese templatgebundener Peptide	109
5.6.1	Methode - Native chemische Ligation	109
5.6.2	NCL von TG ^{1st} und C[GPP] ₇	109
5.6.3	Vergleich der NCL von TG ^{1st} und TG ^{2nd} mit CPP[GPP] ₄	117
5.6.4	NCL von TG ^{2nd} und CPP[GPP] ₄ (CMP ^(+T-S) und CMP ^(+T+S))	119
5.7	CD-Messungen templatgebundener Peptide	122
5.8	Oxidation und Equilibrierung von wc2-Peptiden	123
5.8.1	Oxidation der wc2-Peptide: Pep ^{GPP} , Pep ^{GSP} , Pep ^{ψN} , Pep ^{ψC/N} , Pep ^{ψC}	123
5.8.2	Equilibrierung der wc2-Peptide: Pep ^{GPP} , Pep ^{GSP} , Pep ^{ψN} , Pep ^{ψC/N} , Pep ^{ψC}	123
5.8.3	CD-Messungen der wc2-Peptide: Pep ^{GPP} , Pep ^{GSP} , Pep ^{ψN} , Pep ^{ψC/N} , Pep ^{ψC}	123
5.8.4	Oxidations/Reduktion der wc2-Peptide: wc2-[GPP] _{3/7/50}	124
5.8.5	CD-Messungen der wc2-Peptide: wc2-[GPP] _{3/7/50}	124
5.9	Oxidationskontrollexperimente unter Verwendung von Pep ^{GSP}	125
5.10	Kontrolle der Integrität des DEPSI Segments in wc2-Schaltpeptiden	127
5.11	Synthese und Charakterisierung der wc2-Peptide	130
5.11.1	Synthese von Pep ^{ψN} , SWCGTTPG(ψ)SWCGT[GPP] ₆ GPP	131
5.11.2	Synthese von SWCGTTPGSWCGT-[GPP] ₇	132
5.11.3	Synthese von Pep ^{ψC/N} , SWCGTTPG(ψ)SWCGT[GPP] ₆ G(ψ)SP	133
5.11.4	Synthese von Pep ^{ψC} , SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₆ G(ψ)SP	134

5.11.5	Synthese von Pep^{GSP} , SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₆ GSP	135
5.11.6	Synthese von wc2-[GPP] ₃ , SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₃ -NH ₂	136
5.11.7	Synthese von wc2-[GPP] ₇ , SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₇ -NH ₂	137
5.11.8	Synthese von wc2-RDG, SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₇ GRDGSPG-NH ₂ . .	138
5.11.9	Synthese von wc2-RGD, SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₇ GRGDSPG-NH ₂ . .	139

Literaturverzeichnis	150
-----------------------------	------------

Anhang	151
---------------	------------

5.12	CD-Spektren	151
------	-----------------------	-----

1 Motivation und Zielstellung

Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein vielzelliger Tiere. Dessen hervorragende Eigenschaften, wie z. B. Biokompatibilität und Zugfestigkeit, ermöglichen den Einsatz in Bereichen der Gewebezüchtung (*tissue-engineering*), der Kosmetik oder der Pharmakologie.¹⁻⁴ Allerdings wird der weit verbreitete Einsatz von natürlichem Kollagen, gewonnen aus tierischem Gewebe, durch Komplikationen wie, z. B. das Risiko der Pathogenen-Übertragung bzw. die Einschleppung von Prionen, die für die Auslösung der Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) diskutiert werden, beschränkt.⁵⁻⁷ Zudem besteht bei den so gewonnenen Kollagenmaterialien meist eine hohe Varianz zwischen verschiedenen Lieferbatches (*batch to batch variation*).⁸ Darüber hinaus bleibt die Extraktion von Säugetierkollagen aus biologischen Ressourcen mit einer intakten, nativen Struktur schwierig und eine Reinigung ohne Denaturierung ist aufgrund der vernetzten Struktur der Kollagensegmente nicht durchführbar. Während die Biosynthese und Bioprozessierung von Kollagen relativ gut erforscht und somit möglich ist,⁹ basieren die Probleme in der synthetischen Herstellung auf der definierten Ausbildung der einzigartigen Kollagenstruktur.¹⁰ Daher besteht seit langem ein Interesse daran, Anordnungen künstlicher Kollagenmaterialien zu verstehen und zu kontrollieren. In der vergangenen Dekade erlangten kollagenartige Peptide (collagen mimetic peptides, CMPs) immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Forschung.^{4,11,12} Diese synthetischen Modellsysteme bilden einen vielversprechenden Ansatz zum tieferen Verständnis der Kollagen-Tripel-Helix (*collagen triple helix*, CTH) mit dem Ziel, die Bildung jener Helix über gezielte Peptid-Organisation zu erreichen.^{3,4}

Ziel dieser Arbeit war die Erzeugung von Templat-Protein-Hybriden, welche zu anisotropen Nanobausteinen organisiert werden sollten, die zur Bildung fibrillärer, kollagenartiger Bündelstrukturen führen. Abschließend sollte eine Prozessierung dieser Systeme zu Gerüstmaterialien für die Zellkultivierung erfolgen. Im Sinne eines modernen Molekül-Designs sollte eine neue Hybrid-Molekülklasse etabliert und genauer untersucht werden. Die im Rahmen der Arbeit aufgebauten Materialien sollten einige kollagen-ähnliche Eigenschaften, aber auch möglicherweise Potentiale für zusätzliche, artifiziell eingefügte Eigenschaften aufweisen. Hierfür sollte, neben der Festphasenpeptidsynthese auch eine biotechnologische Syntheseroute (bakterielle Produkti-

on) für Kollagen-inspirierte Proteineinzelstränge mit einer Templatstrategie (organische Synthese) kombiniert werden. Die Selbstorganisation der dargestellten Templat-Protein-Hybride sollte einen zweistufigen Strukturbildungsprozess ermöglichen.

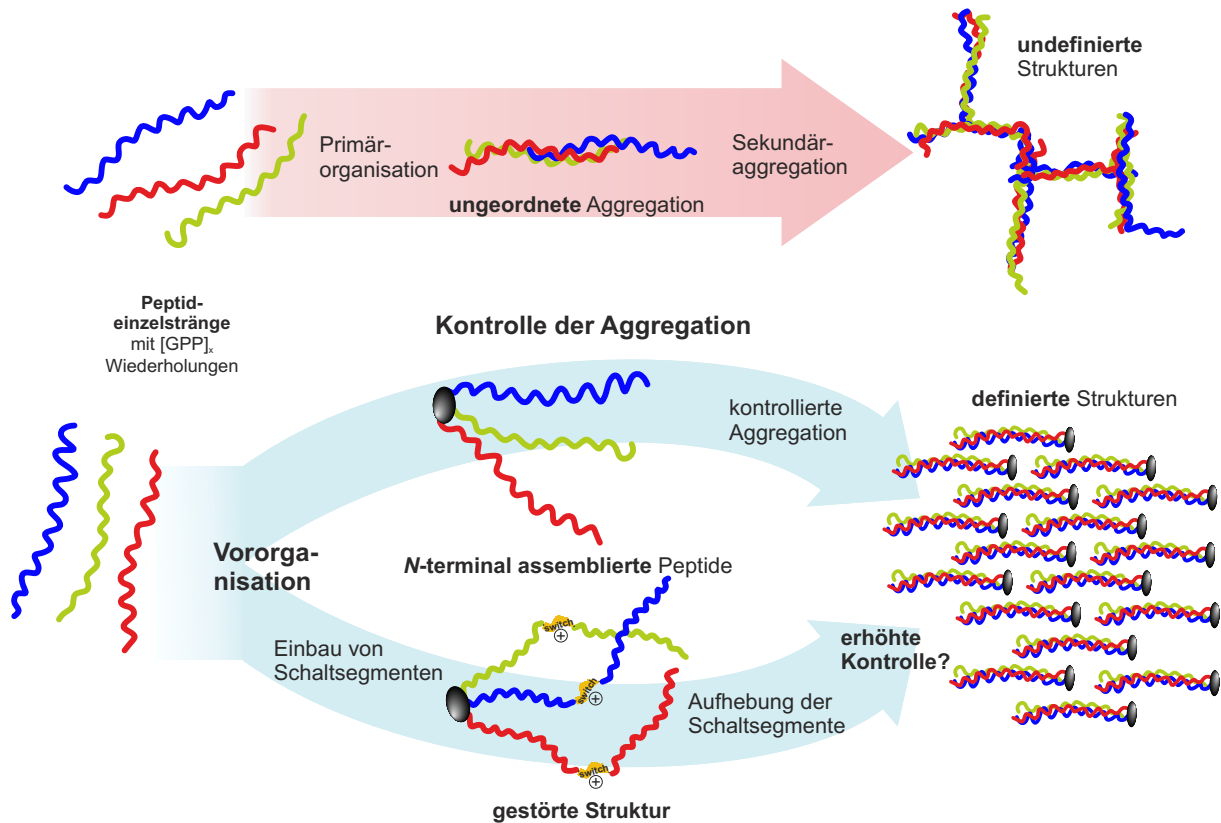


Abbildung 1.1. Schematische Übersicht der Problemstellung, oben: ungeordnete Aggregation („Gelatinebildung“) soll unterdrückt werden; unten: Kontrolle der Strukturbildung durch Assemblierungsstrategien als auch pH gesteuerter Schaltung.

Im Rahmen des Projekts sollte gezeigt werden, dass die Templat-Protein-Hybride, ähnlich der natürlichen Kollagenbildung, geführt werden können. Es sollte dabei von einem vollständig denaturierten Ausgangspunkt gestartet werden, gefolgt von primärer Bildung von Nanobausteinen mit diskreter Dreifachhelix, bis hin zu einer nematischen Mesophase, wobei die ungeordnete Aggregation („Gelatinebildung“) unterdrückt werden sollte (Abbildung 1.1). Neben der direkten Selbstorganisation der Kollagenmimetika sollte auch die Möglichkeit der Schaltbarkeit der Peptidstruktur genauer untersucht werden, um eine aktive Regulation der hierarchischen Strukturbildung zu etablieren. Die Prozessierung dieser Systeme sollte den Zugang zu Fasern mit geordneter innerer Struktur erlauben, welche im Kontakt mit Zellen in Bezug auf deren Eignung als Gerüststrukturen für die Zellkultivierung untersucht werden sollten.

2 Einführung und Grundlagen

2.1 Kollagen

Kollagen ist das am häufigsten auftretende Strukturprotein in Tieren, es stellt z. B. im Menschen ein Drittel des gesamten Proteingehalts dar. Etwa 75 % des Trockengewichts der Haut bestehen aus Kollagen und auch im Bindegewebe bzw. der extrazellulären Matrix (EZM) stellt Kollagen den höchsten Anteil aller Proteine. Dabei existieren 28 verschiedene Arten von Kollagen, bestehend aus mindestens 46 verschiedenen Polypeptidketten.^{3,13–15} Basierend auf Struktur und supramolekularer Organisation lassen sich Kollagene in Fibrillen-bildene Kollagene, Fibrillen-assoziierte Kollagene (FACIT, *Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices*), Netzwerk-bildene, Ankerfibrillen, Transmembran-Kollagene und Andere einteilen. Die verschiedenen Kollagentypen sind durch eine beträchtliche Komplexität und Diversität bzgl. Struktur, Spleißvarianten, dem Auftreten von zusätzlichen, nicht-helikalen Domänen, der Zusammensetzung und Funktion gekennzeichnet. Die häufigste und weit verbreitetste Familie von Kollagenen, mit einem Anteil von ungefähr 90 % des gesamten Kollagens, sind die Fibrillen-bildenden Kollagene. Kollagenfibrillen vom Typ I und V tragen zum strukturellen Rückgrat von Knochen bei, und Kollagene vom Typ II und XI tragen vorwiegend zur fibrillären Matrix von Gelenkknorpel bei. Ihre Torsionsstabilität und Zugfestigkeit führen zur Stabilität und Integrität dieser Gewebe.^{13,16,17} Typ I ist das am besten untersuchte und am weitesten verbreitete Kollagen. Es bildet 90 % der organischen Masse in Knochen, Sehnen, Haut, Bändern oder der Hornhaut.¹³ Das ebenfalls Fibrillen bildene Kollagen Typ II ist hingegen vorherrschender Bestandteil des hyalinen Knorpels (stellt dort 80 % des Kollagenanteils) und wichtige Komponente im Glaskörper, dem Hornhautepithel, der Chorda dorsalis und der Nucleus pulposus der Bandscheiben.¹³ Die lebenswichtige Bedeutung von Kollagen als Gerüst für Tiere erfordert eine Vielzahl von wesentlichen Eigenschaften. Diese Eigenschaften umfassen thermische Stabilität, mechanische Festigkeit und die Fähigkeit, spezifische Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen einzugehen. Um zu verstehen, wie solche Eigenschaften aus der Kollagen abgeleitet werden, ist ein umfassendes Wissen über die Mechanismen, die der Helix-Struktur und -Stabilität zugrunde liegen, erforderlich.

2.1.1 Kollagen-Struktur

Der erste Nachweis der Kollagen-Dreifachhelix-Struktur erfolgte im Jahr 1954 von Ramachandran und Kartha^{18,19} durch Faserbeugungsuntersuchungen. Sie bestätigten die bis dahin von Asbury und Bell²⁰ postulierte Struktur einer rechtshändigen Dreifachhelix. Diese sollte aus drei gestaffelten, linksgängigen Polyprolin II (PPII) Helices, in der alle Peptidbindungen in der Transkonformation vorliegen, bestehen. 1955 wurde diese Struktur von Rich und Crick^{21,22} sowie Cowan *et al.*²³ weiter präzisiert und ist bis heute akzeptiert.¹⁴ Die charakteristische Kollagen-Dreifachhelix (*collagen triple helix*, CTH) setzt sich aus drei Peptideinzelsträngen zusammen. Jede dieser α -Peptidketten bildet eine erweiterte linksgängige Helix und je drei Stränge zusammen ordnen sich in einer rechtsgängigen Kollagendreifachhelix an (siehe Abbildung 2.1). Bei den Strängen kann es sich um drei identische (Homotrimer) Stränge, wie z. B. in Typ II Kollagen (drei $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten) oder auch um verschiedene Stränge (Heterotrimer), wie in Typ I Kollagen (zwei $\alpha 1(\text{I})$ und eine $\alpha 1(\text{II})$ -Kette) handeln.²⁴

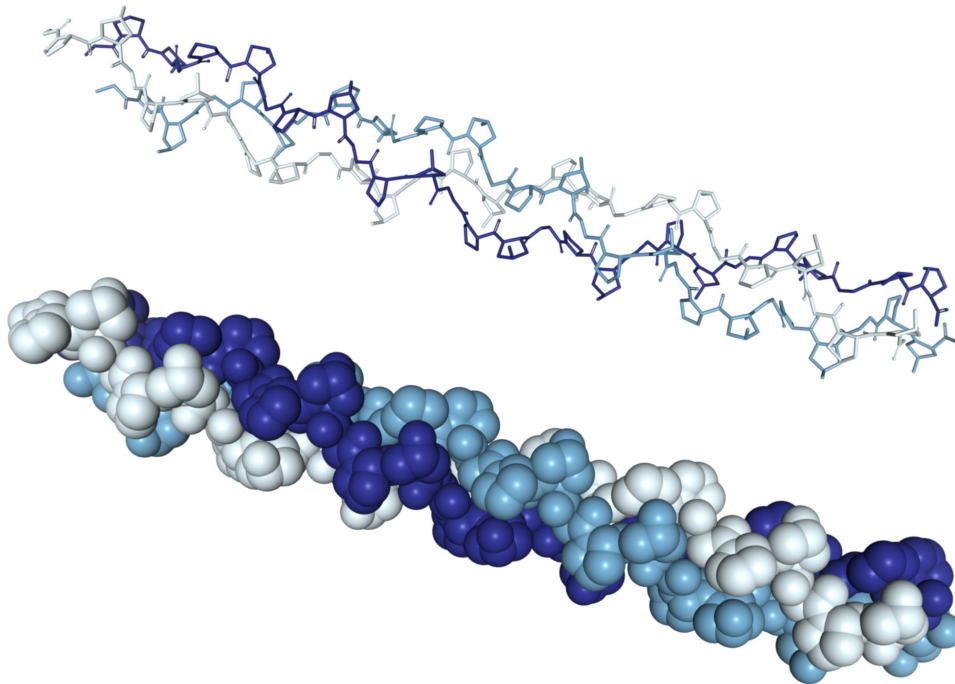


Abbildung 2.1. Kollagen Dreifachhelix (Gly-Pro-Hyp)₉ nach PDB Eintrag 3B0S. Kalottenmodell (unten) und Stäbchenmodell, Einfärbung nach Peptideinzelsträngen.

Diese drei parallelen Polyprolin II Helices sind in der CTH genau um einen Aminosäurerest versetzt angeordnet. Diese dichte Anordnung kann nur erreicht werden, wenn an jeder dritten

Position in den Einzelsträngen Glycin eingebaut wird. Die resultierende Aminosäureabfolge von Gly-Xaa-Yaa kommt in allen Typen des Kollagens vor, kann aber auch in bestimmten Bereichen unterbrochen werden, wie z. B. bei nicht-fibrillaren Kollagen.²⁵ Somit können die Positionen Xaa und Yaa von verschiedensten Aminosäuren eingenommen werden. Allerdings wird die Xaa am häufigsten von (2*S*)-Prolin (28 %) und die Yaa Position von (2*S*,4*R*)-4-Hydroxyprolin (38 %) besetzt. Das resultierende Triplet Gly-Pro-Hyp ist somit die am meisten vertretene Aminosäureabfolge mit 10.5 %.^{14,26,27}

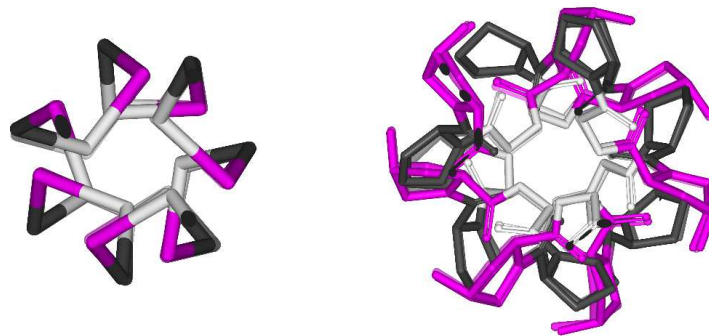


Abbildung 2.2. Struktur der Kollagen-Dreifachhelix, Aufsicht auf (Gly-Pro-Hyp)₉ nach PDB Eintrag 3B0S; Peptidrückrad (links), Stäbchenmodell (rechts); Färbung nach Aminosäure: Glycin (weiß), Prolin (schwarz), Hydroxyprolin (violett).

Die Anordnung der Peptidstränge in einer dreifach-helikalen Struktur wird maßgeblich von der Aminosäureabfolge und deren gegenseitigen Wechselwirkungen z. B. durch Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst. So ist Glycin in dieser Formation nach innen ausgerichtet und bildet durch seine HN-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit der C=O-Gruppe einer Aminosäure in Xaa eines Nachbarstranges aus (siehe Abbildung 2.3). Alle Seitenkettenfunktionalitäten der Xaa und Yaa Aminosäuren sind dementsprechend nach außen gerichtet, was die Wechselwirkung mit Wassermolekülen erlaubt, und zusätzlich zur Stabilisierung der Helix beiträgt.

1994 stellten Bella *et al.*²⁸ die ersten hochauflösenden Kristallstrukturuntersuchungen dreifach-helikaler kollagenartiger Peptide vor (*collagen related peptides*, CRP), welche die Wasserstoffbrückenbindungen $\text{N-H(Gly)} \cdots \text{O=C(Xaa)}$ bestätigten und zusätzlich die Existenz von $\text{C}_\alpha\text{-H(Gly/Yaa)} \cdots \text{O=C(Xaa/Gly)}$ nachwiesen. Anhand dieser Röntgenkristallstrukturuntersuchungen Prolin-reicher CRPs konnte auch die Helixstruktur genauer ermittelt werden. Diese

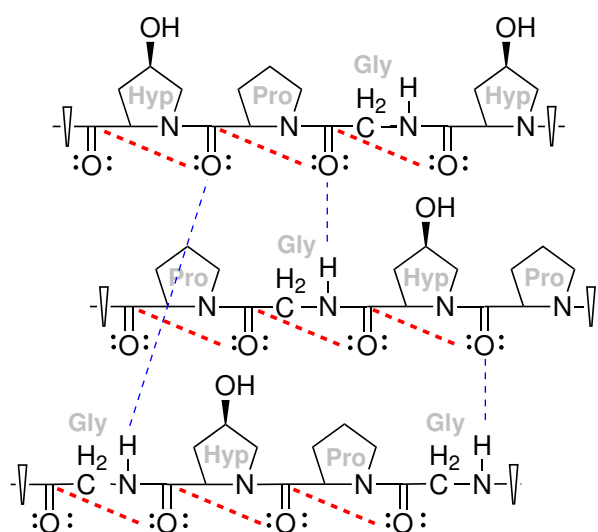


Abbildung 2.3. Struktur der Kollagen-Dreifachhelix. Wasserstoffbrückenbindung (blaue Linien), $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkungen (rote Linien).

zeigten eine Helixsymmetrie von $7/2$. Dies entspricht 7 Gly-Xaa-Yaa Einheiten mit 2 Helixumdrehungen auf einer Länge von 20 \AA .²⁹ Eine Alternative dazu stellte die von Rich und Crick^{21,23} postulierte Struktur mit $10/3$ (10 Wiederholungen auf 3 Helixumdrehungen, 28.6 \AA) dar, die sie mittels Faserbeugung von natürlichem Kollagen ermittelten.²⁹ Untersuchungen von CRPs, welche Sequenzen natürlichen Kollagens enthielten zeigten, dass beide Strukturen Berechtigung haben und deren Vorkommen abhängig von Verlauf und der Zusammensetzung der Peptidkette variieren können.^{30–35} In diesen Ketten ist die stetige Wiederholung der $\text{N-H(Gly)} \cdots \text{O=C(Xaa)}$ Wasserstoffbrückenbindung von zentraler Bedeutung. Um deren Einfluss genauer zu bestimmen, wurde von Jenkins *et al.*³⁶ die Amidbindung durch einen Ester ausgetauscht, wodurch sich eine Stärke der Amidbindung von $\Delta G^\circ = -2.0 \text{ kcal/mol}$ ermitteln ließ. Weitere Untersuchungen von Boryskina *et al.*³⁷ zeigten ähnliche Werte für ein poly(GlyProPro) System von $\Delta G^\circ = -1.8 \text{ kcal/mol}$ und für natives Kollagen $\Delta G^\circ = -1.4 \text{ kcal/mol}$.

Neben Wasserstoffbrückenbindungen leisten eine Reihe weiterer Faktoren einen Beitrag zur Stabilisierung der CTH. So führt die große Anzahl von Prolin und Hydroxyprolin zu einer Vororganisation der Peptideinzelstränge in eine PPII Helix, was die entropischen Kosten von Kollagen senkt.³⁸ Die Häufigkeit von Prolin führt aber auch zu Einschränkungen bezüglich der Faltung in eine Dreifachhelix. Da Prolin aufgrund seiner sekundären Aminogruppe tertiäre Amine in einem Peptid bildet, führt das zu einer Isomerisierung in *trans*- und *cis*-Isomere. In Kollagen liegen

diese alle in der *trans*-Konfiguration vor, was im Umkehrschluss bedeutet, dass für eine stabile Dreifachhelix zunächst alle entsprechenden Aminosäuren (Prolin und dessen Derivate) zunächst in *trans*-Konfiguration isomerisieren müssen. Dies beruht vornehmlich auf dem stereoelektronischen Effekt der $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung (Abbildung 2.4 (A)). Dabei gibt der Sauerstoff einer Peptidbindung Elektronendichte seiner freien Elektronenpaare an das antibindende Orbital π^* der benachbarten Carbonylbindung. Diese $n \rightarrow \pi^*$ Interaktion kann bevorzugt auftreten, wenn die Aminosäuren in der *trans*-Konfiguration vorliegen.^{38–40}

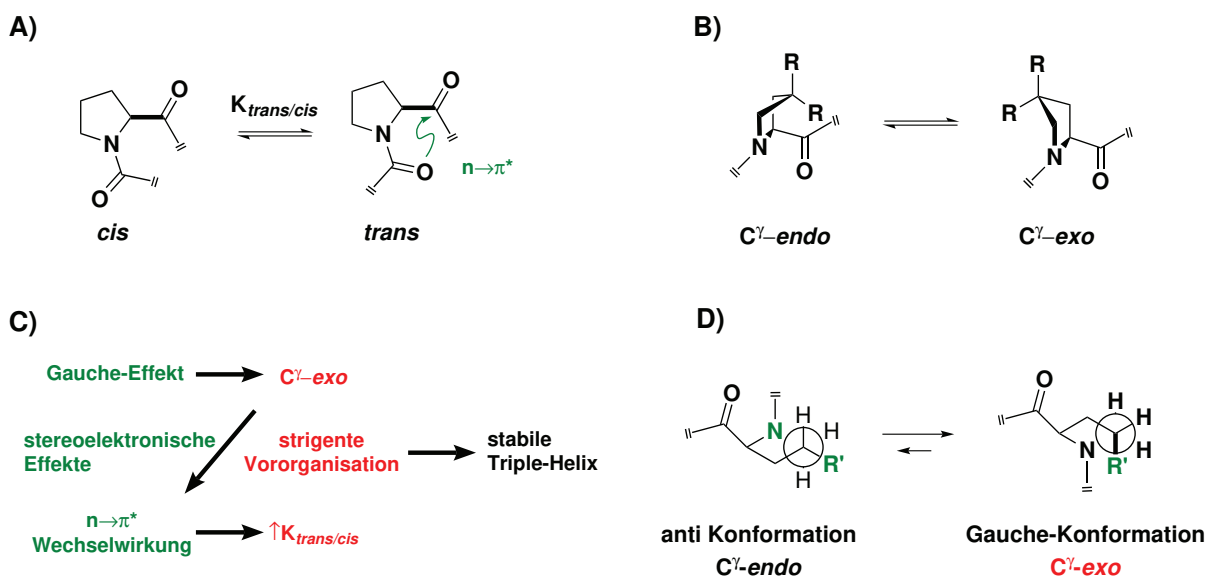


Abbildung 2.4. Darstellung verschiedener Faktoren, die einen Einfluss auf die Dreifachhelix ausüben.¹⁴ A) Prolin *cis-trans* Isomerisierung. Prolin bildet tertiäre Amidbindungen, was in einem erhöhten Anteil an *cis*-Konformation resultiert. Eine $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkung stabilisiert das *trans*-Isomer der Peptidbindung; B) Ring-Konformation, *C^γ-exo* ist z. B. bei Hyp bevorzugt; C) Der Gauche-Effekt und die $n \rightarrow \pi^*$ Wechselwirkungen ordnen die Hauptkettentorsionswinkel und erhöhen die Dreifachhelixstabilität; D) Gauche-Effekt durch elektronenziehende Gruppe in R'. (Schema adaptiert aus Ref.¹⁴)

Um den Einfluss auf die Helixstabilität von Hydroxyprolin in der Yaa Position genauer zu verstehen tauschten Holmgren *et al.*⁴¹ Hydroxyprolin durch 2*S*,4*R*-4-Fluorprolin (Flp) aus. Dies führte zu einer hyperstabilen Dreifachhelix, mit einem Schmelzpunkt von 91 ± 1 °C für (ProFlpGly)₁₀. Dieser Wert lag um ca. 20 °C höher als der des Vergleichssystems (ProHypGly)₁₀. Da Flp keine Wasserstoffbrückenbindungen eingehen kann, war anzunehmen, dass die Stabilität dieser Dreifachhelix, auf induktiven Effekten basiert.^{41,42} Wird hingegen in der Yaa Position ein Diastereomer von Flp das 2*S*,4*S*-4-Fluorprolin (flp) eingesetzt, führt dies zu einer Minderung

der Helixstabilität.³⁹ Da somit der Einfluss der Stereochemie der elektronegativen Substituenten auf der 4-Position des Pro-Rings entscheidend ist, handelt sich nicht um eine einfache Stabilisierung durch induktive, sondern stereoelektronische Effekte. Dies ist auf die Ringkonformation des Pro und dessen Derivate zurückzuführen, welche in *C^γ-exo* oder *C^γ-endo* vorliegen können (siehe Abbildung 2.4 (B)). Prolin in der Xaa Position liegt leicht bevorzugt in der *C^γ-endo* Konformation vor, während Hyp oder auch Flp in der Yaa Position zu *C^γ-exo* dirigieren.⁴⁰ Somit lässt sich auch der Einfluss von elektronenziehenden Gruppen in der 4-Position erklären. Diese sorgen über den Gauche-Effekt für eine Vororganisation über Ausrichtung der Hauptkettentorsionswinkel (Abbildung 2.4 (D)).^{39,43} Es liegt eine vorteilhafte Torsionswinkelordnung und somit eine stabile Dreifachhelix vor, wenn in der Xaa Position eine Aminosäure mit *C^γ-endo* und in der Yaa Position eine Aminosäure mit *C^γ-exo* Konformation vorhanden ist.¹⁴ Weitere Untersuchungen von Erdmann und Wennemers⁴⁴ zeigten hingegen, dass eine C(4)-*endo* Konformation in der Yaa toleriert werden kann, wenn die Diederwinkel und das *cis/trans*-Verhältnis die Bildung einer Dreifachhelix begünstigen. Zudem haben nach diesen Untersuchungen die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen im Vergleich zu der Ringkonformation eine größere Bedeutung als bisher angenommen. Es kann somit festgehalten werden, dass die Struktur und Stabilität der Kollagendreifachhelix auf einem komplizierten Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren beruht und eine gezielte Ausbildung dieser Struktur hochgradig komplex ist. In der Natur wird diese Synthese über mehrere enzymatisch gesteuerte Prozesse erreicht.

2.1.2 Kollagen in der Natur

Kollagene sind sekretorische Proteine, deren Biosynthese einem einzigartigen Ablauf folgt, der umfangreiche posttranslationale Modifikationen beinhaltet. Die biosynthetische Route von Kollagenfasern z. B. des Typs I beginnt mit der Transkription von Prokollagen-Genen $\alpha 1(I)$ und $\alpha 2(I)$ mit der anschließenden Synthese von Protokollagen- α Ketten am Ribosom. In der Folge entstehen zwei $\alpha 1(I)$ und eine $\alpha 2(I)$ Ketten, die katalysiert durch eine Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) am C-Terminus über Disulfidbrücken verbunden werden. Anschließend wird Prolin in der Yaa Position durch die Prolyl-4-hydroxylase hydroxyliert (Abbildung 2.5). Diese Hydroxylierung ist für die spätere Formierung der Dreifachhelix von besonderer Bedeutung.

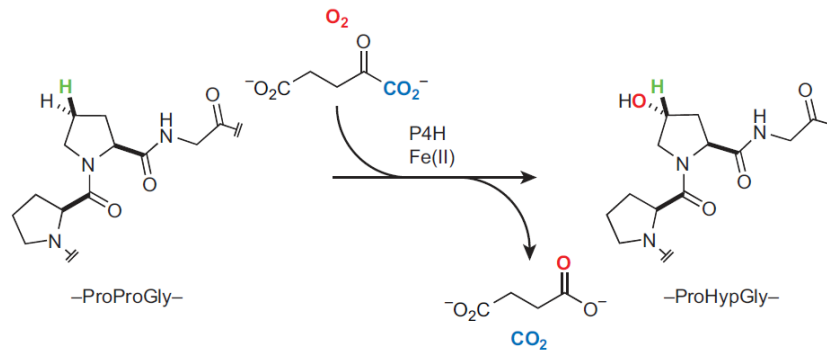


Abbildung 2.5. Prolin in der Yaa Position der Protokollagen-Triplets werden durch Prolyl-4-hydroxylase (P4H) modifiziert. P4H ist ein Nicht-Häm-Eisenenzym, das die posttranslationale und stereoselektive Hydroxylierung des nichtaktivierten γ -Kohlenstoffs von Prolin-Resten in der Yaa-Position unter Bildung von Hydroxyprolin katalysiert.¹⁴

Zudem wird jeweils ein Prolin in $\alpha 1(I)$ durch Prolyl-3-hydroxylase (P3H) zu 3-Hydroxyprolin modifiziert. Dieses bildet mit weiteren Proteinen eine Peptidylprolyl-*cis-trans*-isomerase. Die hier ablaufende Isomerisierung in die *trans*-Konfiguration ist fundamental für die korrekte Ausbildung der Kollagenhelix. Etwa ein Drittel der Lysine, welche sich in Yaa Position befinden, werden durch die Lysylhydroxylase zu 5-Hydroxylysin modifiziert, gefolgt von der Faltung in eine Tripel-Helix. Die Faltung in eine Dreifachhelix erfolgt vom *C*- zum *N*-Terminus, da sich die Disulfidverknüpfungen am *C*-Terminus befinden. An den Enden dieses Prokollagens werden über *N*- und *C*-Proteinasen nicht kollagenartige Domänen gebildet, die als Telopeptide bezeichnet werden und zur Bildung übergeordneter Strukturen beitragen. Bei diesem Schritt werden zudem die Disulfidverknüpfungen zwischen den Peptidsträngen enzymatisch gespalten und somit die Disulfidbrücken getrennt. Das gebildete Tropokollagen besitzt eine dreifach-helikale Struktur, die eine Breite von <5 nm und eine Länge von ≤ 300 nm aufweist. Durch Selbstorganisation werden Kollagen-Microfibrillen gebildet, die durch Lysyloxidasen (Oxidation der Lysin-Seitenketten) vernetzt werden und zur Bildung von Kollagenfasern mit einer Länge von ≤ 1 cm führen.^{14,45} Diese Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen und die komplexe Selbstorganisation, die den Kollagenen zu ihrer einzigartigen Struktur verhelfen, zeigt die Problematiken auf, die mit der synthetischen Herstellung von kollagenartigen Peptiden einhergehen.

2.2 Synthetisches Kollagen - kollagenartige Peptide

Schon seit den Faserbeugungsuntersuchungen von Rich und Crick^{21,22} wurde deutlich, dass die Strukturaufklärung von Kollagen durch dessen Größe, Unlöslichkeit, repetitiver Sequenz und komplexen hierarchischen Struktur eine Herausforderung darstellen sollte. Dies eröffnete in den späten 1960iger Jahren ein neues Forschungsgebiet der kollagenartigen Peptide (*collagen-related peptides*, CRP oder *collagen-mimetic peptides*, CMP).⁴⁶ Mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellte CMPs lieferten einen maßgeblichen Beitrag zur Strukturaufklärung von Kollagen wie in Abschnitt 2.1.1 bereits erläutert. Die folgenden Abschnitte behandeln den Einsatz von CMPs zur Synthese, Kontrolle und Nachahmung der Kollagen-Tripel-Helix.

2.2.1 Selbstorganisationsstrategien

Synthetische kollagenartige Peptide bieten ein exzellentes Werkzeug zur Untersuchung der thermischen Stabilität, als auch der Faltungseigenschaften tripel-helikaler Peptide. Dabei wird in der Regel auf unterschiedliche Organisationsstrategien zurückgegriffen, um drei Peptidstränge zusammenzuführen. Bei den Strängen kann es sich um drei identische Stränge (Homotrimer), oder auch um verschiedene Stränge (Heterotrimer) handeln.²⁴ Erste Versuche zur Synthese von CMPs erfolgten über Polykondensation von Tri- oder Hexapeptiden, was jedoch zu Produkten mit hoher Molekulargewichtsverteilung führte.⁴⁵ Mit der Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese konnten Peptide mit einer definierten Kettenlänge zugänglich gemacht werden, die die Untersuchung kollagenartiger Peptide wie $(\text{Gly-Pro-Pro})_n$ oder $(\text{Gly-Pro-4(R)Hyp})_n$ mit $n = 5$ bis 15 ermöglichte. Sutoh und Noda⁴⁷ stellten als erstes ein Konzept vor, bei dem Blockcopolymeren mit zwei $(\text{Gly-Pro-Pro})_n$ Blöcken mit $n = 5, 6$ oder 7 durch einen Block von $(\text{Ala-Pro-Gly})_m$ mit $m = 5, 3, 1$ getrennt wurden. Dieses Host-Guest-System wurde von Persikov *et al.*⁴⁸ auf alle natürlichen Aminosäuren erweitert und ermöglichte es, Einflüsse der verschiedenen Aminosäuren auf die Kollagen-Tripel-Helix-Stabilität zu untersuchen. Es wurde ersichtlich, dass nicht kovalente Wechselwirkungen eine maßgebliche Rolle bei der Bildung der Struktur einnehmen. Diese Wechselwirkungen können gezielt für die Selbstorganisation von Peptidsträngen eingesetzt werden.

2.2.2 Selbstorganisation mittels nicht-kovalenter Wechselwirkung

Ramshaw *et al.*²⁶ zeigten die hohe Relevanz geladener Aminosäuren wie Lysin, Arginin, Glutaminsäure und Asparaginsäure, die 15-20 % aller Aminosäuren in Kollagen darstellen. 40 % der Gly-Xaa-Yaa Triplets enthalten mindestens eine geladene Aminosäure. Sie sind essentiell für die Assoziation von Kollagenfasern und tragen zur Helixstabilität bei. Der starke Einfluss lässt sich auf den Versatz um je eine Aminosäure der Peptidstränge untereinander, als auch der rechtsdrehenden Rotation erklären. Diese Faktoren führen dazu, dass die entsprechenden Aminosäuren nahe zueinander gebracht werden (siehe Abbildung 2.6). Dadurch werden elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Ketten ermöglicht.⁴⁹ Diese paarweise Interaktion und deren Auswirkung auf die Helixstabilität wurde, unter Verwendung von Modellpeptiden, intensiv untersucht. Persikov *et al.*⁵⁰ z.B. setzten gegensätzlich geladene Aminosäuren in das Host-Guest-System (GPO)₃GXY(GPO)₄ (O = Hydroxyprolin), was zu einer wesentlichen Stabilisierung der Dreifachhelix führte. Aminosäuren, welche sich gegenseitig abstoßen bewirken das Gegenteil, wenn sie in Position Xaa und Yaa untergebracht werden.

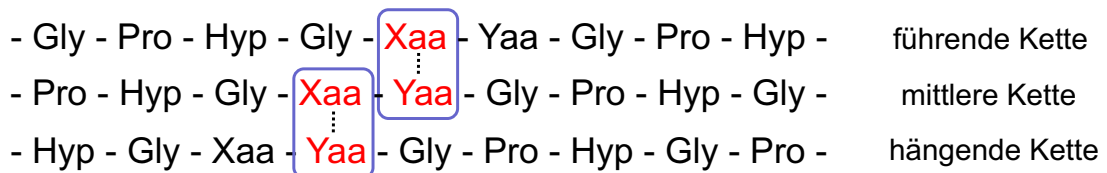


Abbildung 2.6. Mögliche Wechselwirkung zwischen den Ketten an Position Xaa und Yaa der jeweiligen Nachbarkette.³

Neben Wechselwirkungen innerhalb der gleichen Triplets wurden auch ähnliche stabilisierende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen benachbarten Triplets beobachtet. Eine Studie zur thermischen Stabilität von Peptiden in der Form (GPO)₃-G-X-Y-G-X'-Y'-(GPO)₃ deutete auf einen starken Stabilisierungseffekt in Gegenwart von GPKGEO- oder GPKGDO-Sequenzen hin, die zu Schmelztemperaturen (T_m) ähnlich der unsubstituierten Kontrolle (GPO)₈ führen.⁵¹ Nicht-kovalente Wechselwirkungen spielen also eine essentielle Rolle bei der Anordnung der Dreifachhelix und können eingesetzt werden, um eine Vororganisation der Stränge herbeizuführen. Gauba und Hargerink⁵² nutzten die Coulomb-Wechselwirkung um die Peptidassemblierung heterotrimerer Dreifachhelices zu steuern. Sie fanden heraus, dass eine 1:1:1 Mischung der Peptide

(ProLysGly)₁₀:(AspHypGly)₁₀:(ProHypGly)₁₀ ähnliche thermische Stabilität wie ein Homotrimer aus (ProHypGly)₁₀ aufweist, obwohl Asp und Lys die Helixstabilität herabsetzen. So können zum Beispiel „klebrige Enden“ eingesetzt werden, um erhöhte Kontrolle in der Kollagen-Tripel-Helix (CTH) Anordnung zu erhalten, was zu Materialien mit beachtlichen Eigenschaften führte, die auf die interne Struktur zurückzuführen waren.^{53,54} Es erfolgte eine Unterteilung dieser Wechselwirkung in zwei Kategorien.⁴ Die Wechselwirkungen von der Führungskette zur mittleren Kette, sowie von der mittleren Kette zur hängenden Kette wird als axialer Kontakt bezeichnet. Wohingegen die Wechselwirkung zwischen der hängenden Kette und der führenden Kette als seitlicher Kontakt bezeichnet wird. Es wurde angenommen, dass die Stabilisierung hauptsächlich von den beiden axialen Wechselwirkungen herrührt.

Tanrikulu *et al.*⁵⁵ nutzten dieses Konzept der „klebrigen Enden“ über die gesamte Peptidsequenz aus. Dabei lässt sich der Peptidstrang in drei Abschnitte unterteilen: einem neutralen Segment mit (POG)₄ (Hyp = O), einem kationischen (PKG)₄ und einem anionischen (DOG)₄ Segment. Diese Domänen sind gleichmäßig über ein 42mer verteilt, was in vier Salzbrücken zu je 14 Aminosäuren resultiert. Durch sorgfältige Auswahl der Länge und der Polaritäten, als auch des Versatzes der Ketten zueinander, entwickelten sie ein Design für CMPs die sich zu langen Tripelhelices mit perfekter Symmetrie zusammenfügen (siehe Abbildung 2.7).

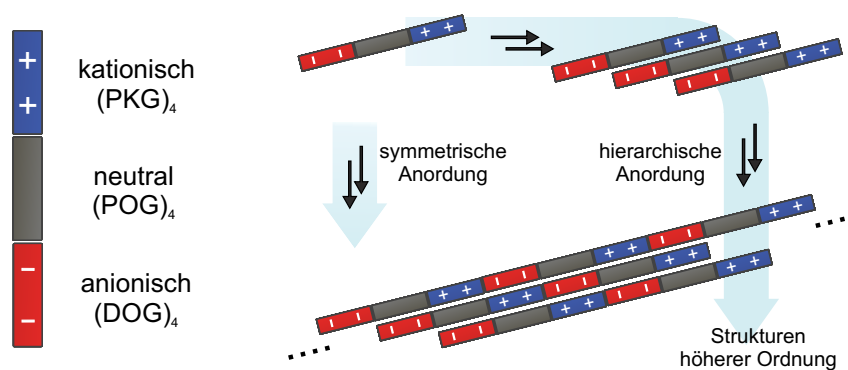


Abbildung 2.7. Vergleich der symmetrischen und der hierarchischen Anordnung. Symmetrisch entworfene CMPs können direkt mit der wachsenden Tripelhelix interagieren, ohne dass zuvor Intermediate mit „klebrigen Enden“ gebildet werden müssen (O = Hydroxyprolin). (Schema adaptiert aus Ref.⁵⁵)

Die so entstandenen „klebrigen Enden“ sind in der gesamten Baugruppe gleichförmig, besitzen identische Interaktion von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zu den Nachbarsträngen und führen zu einem Wachstum der Dreifachhelices. Die Umsetzung dieses Designs resultiert in individuellen Tripelhelices und einer Ausbreitung der Dreifachhelix in zwei Dimensionen. Dadurch wird eine Länge ähnlich natürlichen Kollagens erreicht oder diese übertroffen. Die Strukturen waren trotz des Fehlens einer Assoziation höherer Ordnung thermisch bemerkenswert stabil. Dies ist ein exzellentes Beispiel der Verwendung von supramolekularer Selbstorganisation zur Herstellung stabiler CMP Tripelhelices.

Cejas *et al.*⁵⁶ berichteten über ein neues Kollagen-ähnliches Peptid, das sich durch nichtkovalente Ende-zu-Ende-Wechselwirkungen zu einer dreifach-helikalen, mikrometergroßen fibrillären Struktur zusammenfügen kann.^{56–58} In dieser Arbeit wurde Phenylalanin mit einem elektronenreichen Benzylring und Pentafluorphenylalanin mit einem elektronenarmen Benzylring am C- und N-Terminus des kollagenartigen Peptids (Gly-Pro-Hyp)₁₀ eingeführt. Wenn sich die Phenyl/Pentafluorphenyl-Paare von zwei benachbarten Tripelhelices annähern, nahm die Gesamtgrenzflächenenergie um etwa 55.2 kcal/Mol ab, was zur Bildung von mikrometerlangen Fibrillen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0.26 μm führte. Zusätzlich zu den axialen Wechselwirkungen von Ende-zu-Ende, erfordern die Abmessungen dieser Fibrillen auch eine seitliche (laterale) Wechselwirkung. Vor allem stimulierte dieses CMP die Aggregation von Blutplättchen des Menschen, was die mögliche Verwendung des Peptids als hämostatisches Material demonstriert. Der Vorteil dieser Methoden, welche auf der Erzeugung von dreifach-helikalen CMPs durch nicht-kovalente Wechselwirkungen beruhen, liegt in der vergleichsweise einfachen Synthese und Möglichkeit durch Selbstorganisation Strukturen höherer Ordnung zu erhalten, die in ihrer Struktur und Funktion natürlichem Kollagen ähneln. Eine Alternative stellt die kovalente Bindung von kollagenartigen Peptiden dar. In Anlehnung an den natürlichen Cystein-Knoten (siehe Abschnitt 2.1.2) wurden eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt, die die -Cys-Cys- Oxidation als Vororganisationsstrategie ausnutzen.

2.2.3 Strukturbildung mittels Cys-Knoten

Wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben wurde, wird während der Biosynthese von Kollagen ein Cystein-Knoten am *C*-Terminus der Peptide gebildet, was eine definierte Organisation der Peptidstränge ermöglicht. Diese Art der Assemblierung wurde ausgiebig und in verschiedenster Art und Weise nachgeahmt um kollagenartige Peptide synthetisch herzustellen bzw. vorzuorganisieren. Dabei ist eine Vielzahl verschiedener Knoten denkbar, z.B. enthält das Prokollagen Typ III unterschiedliche Cystein reiche Abschnitte. Zum einen den *C*-terminalen Cys-Knoten, bei dem zwei Cysteine vicinal zueinander liegen und zum Anderen einen Abschnitt in der Propeptid COL1-3 Domäne, in dem weitere Aminosäuren zwischen den Cysteinen liegen.⁵⁹ Ein weiteres Beispiel ist das FACIT Kollagen Typ XIV, welches in den COL1/NC1-Übergängen Cysteine enthält, die strikt durch vier weitere Aminosäuren getrennt voneinander vorliegen. Lesage *et al.*⁶⁰ untersuchten diesen Abschnitt und stellten Sequenzen von $(\text{GXY})_n\text{GxCxxxxC}$ in vitro her. Nach Oxidation bildeten diese über Disulfide Trimere, die eine stabile Dreifachhelix aufwiesen (siehe Abbildung 2.8 (A)). Über Röntgenkristallographie und Kernspinresonanz (NMR, *nuclear magnetic resonance*) Untersuchungen konnte die genaue Anordnung der Disulfidverknüpfungen von acht auf zwei mögliche Strukturen eingeschränkt werden. Cystein-Knoten, ähnlich der in Typ III, in denen die Cysteine vicinal am *C*-Terminus vorliegen, wurden intensiver untersucht. Bei diesen sind ebenso zwei verschiedene Modelle der Verknüpfung möglich (siehe Abbildung 2.8 (B)).⁶¹ Es wurde gezeigt, dass dieser Cystein-Knoten einen effizienten Keim für das Wachstum der Tripelhelix vom *C*-Terminus in einem reißverschlussartigen Mechanismus bereitstellt.⁶² Moroder *et al.*⁶³ untersuchten die Rolle des Cystein-Knotens bezüglich Faltung und Stabilität der Peptide. Sie stellten fest, dass die Thermostabilität Cystein-verknüpfter Peptide $(\text{POG})_5$ (verglichen mit $(\text{POG})_5$ ohne Cysteinknoten) mit zunehmender Schmelze dramatisch verbessert wurde (Erhöhung der Schmelztemperatur von 20.3 °C auf 68.0 °C). Eine ähnliche Stabilisierung wurde auch bei kollagenartigen Peptiden ohne Hydroxyprolin-Anteil ermittelt.^{64,65}

Ein weiteres Beispiel für die Vernetzung von CMPs über cysteinreiche Sequenzabschnitte ist die Verwendung von Heterotrimeren mit insgesamt vier Cystein-Resten, beispielhaft in Abbildung 2.8 (C) dargestellt. Dabei werden zwei Cysteinreste in den mittleren Strang eingebaut und in die restlichen Stränge jeweils ein Cys-Rest.^{66–68} Dies resultiert in einem künstlichen Cystein-

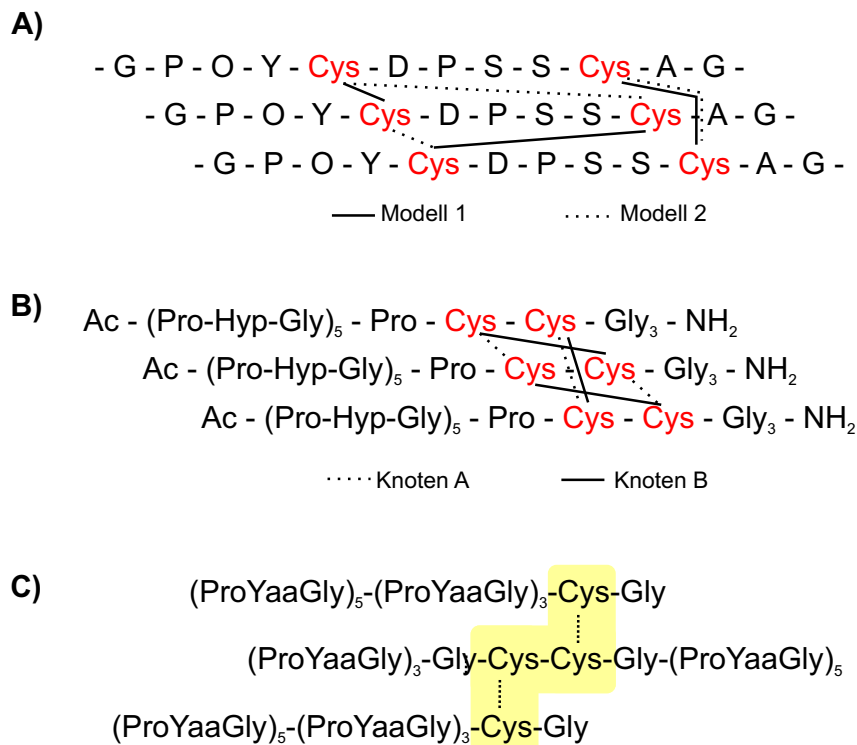


Abbildung 2.8. Verschiedene Arten von Cys-Knoten: (A) natürlicher Cys-Knoten des FACIT Kollagen Typ XIV,⁶⁰ (B) synthetischer Cys-Knoten mit zwei vicinalen Cystein-Resten in jedem Strang,⁶³ (C) synthetischer heterotrimerer Cys-Knoten.¹²

Knoten, in dem zwei Disulfidbrücken alle drei Peptidstränge miteinander verbinden. Um eine definierte Oxidation der gewünschten Stränge miteinander zu erreichen, ist der gezielte Einsatz von orthogonalen Schutzgruppen erforderlich.^{69–71} Dies ist zum einen notwendig um eine regioselektive Oxidation zu erreichen und der starken Tendenz von z. B. (Pro-Hyp-Gly)₅ Homotrimere über Selbstorganisation zu bilden, entgegenzuwirken.⁶⁸ Die Positionierung der Cysteinreste in den Peptidsträngen kann dabei so variiert werden, dass überhängende Peptidfragmente entstehen, die nach einer Präorganisation in Tripelhelices, eine höhergradige Assemblierung mehrerer Trimere ermöglichen.^{12,72,73} Kotch und Raines¹² (Abbildung 2.8 (C)) zeigten die Selbstorganisation solcher Konstrukte in Fibrillen mit einer Länge von bis zu 400 nm. Yamazaki *et al.*⁷³ verwendeten dieses System zur Herstellung kollagenähnlicher Gele mit möglichen Anwendung als Biomaterialien.

Die meisten der untersuchten natürlichen Cystein-Knoten (drei Disulfidbrücken) als auch der künstlichen Cystein-Knoten weisen die entsprechenden cysteinreichen Domänen am *C*-Terminus der Peptide auf. Das deutet darauf hin, dass die Faltung der Dreifachhelix vom *C*-Terminus

zum *N*-Terminus verläuft. Frank *et al.*⁷⁴ erbrachten den Nachweis, dass eine effektive Nukleierung an beiden Enden des kollagenähnlichen Peptids (Gly-Pro-Pro)₁₀ möglich ist. Die Lage der Nukleationsdomäne beeinflusst die Dreifachhelixstabilität, was durch Unterschiede in den Linkersequenzen erklärt werden kann. Es wurde festgestellt, dass die Faltungsraten unabhängig vom Ort der Nukleation sind und die Prolin *cis-trans*-Isomerisierung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt bestätigt (siehe Abschnitt 2.1.1). Der Einsatz von Cystein-Knoten bietet somit ein sehr gutes Werkzeug zur Nukleierung kollagenartiger Peptide und wenngleich die explizite Struktur schwer zu kontrollieren ist, bzw. diese Kontrolle mit erhöhtem Aufwand verbunden ist, kann die thermische Stabilität der CMPs stark erhöht werden. Eine weitere Alternative zur Nukleierung von Peptideinzelsträngen, ist die Verwendung von organischen Templaten. Dabei werden Peptidstränge an Templatmolekülen verankert und somit eine Vororganisation der Stränge herbeigeführt. In dem folgenden Abschnitt werden verschiedene Template vorgestellt und die Thematik genauer erläutert.

2.2.4 Templatstabilisierung

Die Verwendung von Templaten ist eine weitere wichtige Strategie um eine stabile Tripelhelix-Konformation über Vororganisation zu erhalten. In den letzten Jahren wurden große Fortschritte templatunterstützter Synthesemethoden erzielt. Dazu gehören die Verwendung von orthogonalen Schutzgruppen, die chemoselektive Ligation und das Design neuer und zunehmend flexiblerer Template. Eine wichtige Strategie zur Stabilisierung von CTHs (Kollagen-Dreifach-Helices) ist die kovalente Anbindung von drei Peptidsträngen über eine *C*-terminale Verzweigung, ähnlich der des Cystein-Knotens. Diese sollte eine *C*-terminale Ausrichtung der Peptide und somit eine entropische Stabilisierung erzeugen (Abbildung 2.9).⁷⁵ Eine Verzweigung kann z.B. durch selektives Entschützen von Lys-N α - und N ϵ -Aminogruppen erreicht werden.^{76,77} Die Festphasensynthese von dreifach-helikalen Kollagenmodellpeptiden, unter Verwendung eines Lys-Lys-*C*-terminalen Zweigs, erfordert drei verschiedene Schutzgruppenstrategien. Eine Lys N α -Amino-Schutzgruppe, eine Lys N ϵ -Amino Seitenkettenschutzgruppe, die stabil gegenüber den Abspaltbedingungen der N α -Amino-Schutzgruppe sein muss, und eine C α -Carboxylschutzgruppe bzw. ein Linker, welcher Stabilität gegenüber allen Abspaltbedingungen aufweisen muss. Basierend auf dieser Strategie wurden mehrere Verzweigungskombinationen entwickelt.^{75,78–81} Abbildung 2.9 (A) zeigt zudem die Verwendung von Ahx (6-Aminohexansäure) nach der Verzweigung am *C*-Terminus als flexiblen *Spacer*. Eine weitere Aminosäure, über die eine Verzweigung eingebracht werden kann, ist Glutaminsäure.⁸² Dies hat den Vorteil, dass keine komplexe Schutzgruppenchemie verwendet werden muss (Abbildung 2.9 (F)).

Neben diesen Verzweigungen können auch organische Template, die in ihrer Konformation eingeschränkt sind als Gerüst dienen, um Kollagen-Tripelhelices zu induzieren oder zu stabilisieren, ein Beispiel ist das Kemp-Triazid KTA (*cis,cis*-1,3,5-Trimethylcyclohexan-1,3,5-tricarbonsäure, Abbildung 2.9 (C)).^{85,86,90,91} Dieses Templat besitzt drei Carboxylgruppen, die an die *N*-Termini von drei Peptidketten gekoppelt werden können. Die Bindung eines Gly-Rests als *Spacer* zwischen jeder Peptidkette und jeder Carboxylgruppe an KTA ist wichtig, um den nötigen Abstand der Peptidketten untereinander zu gewährleisten, als auch die Synthese zu erleichtern. Zudem wird somit auch die nötige Strukturflexibilität erreicht, die für eine dreifach-helikale Anordnung der Peptidstränge benötigt wird.⁸⁵ Es wurden zwei Syntheserouten verwendet, um Strukturen

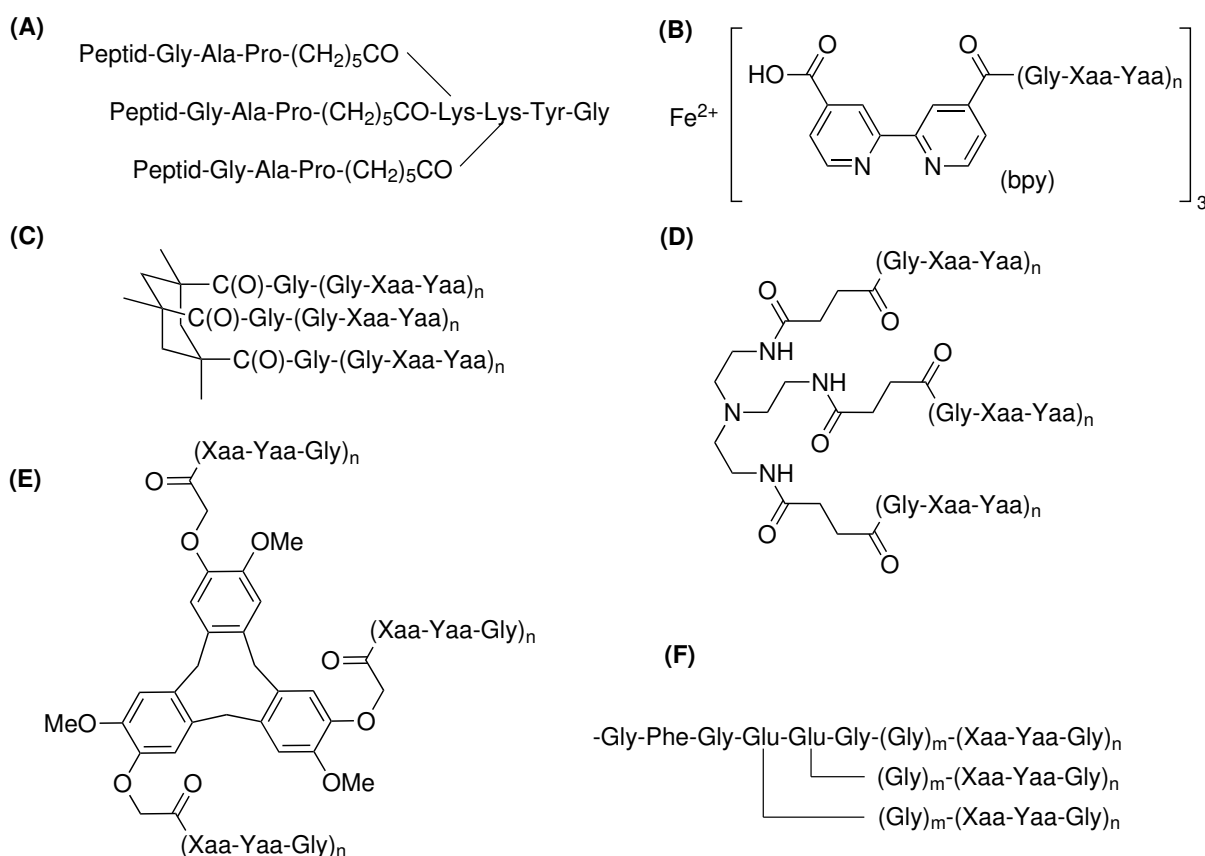


Abbildung 2.9. Auswahl einiger Template für die Vororganisation von kollagenartigen Peptiden: (A) Di-Lys Verzweigung nach Kupplung an 6-Aminohexansäure,⁸³ (B) Koordination von Fe^{II} -Ionen mit Bipyridin-Liganden,⁸⁴ (C) Kemp-Triacid; KTA,^{85,86} (D) Tris(2-aminoethyl)amin (TREN) nach Kupplung an Bernsteinsäure,⁸⁷ (E) Cyclotrimeratrylen (CTV) nach Kupplung an Bromoethansäure,⁸⁸ (F) N-terminaler -GFGE- Baustein.^{82,89}

auf Kollagenbasis aus KTA-Templaten herzustellen. Bei der ersten Route wurde ausschließlich die Festphasenmethode angewendet,⁹¹ während bei der zweiten die Bildung der Peptidbindung zwischen KTA- und Peptidketten in Lösung erfolgte.⁹⁰ Tris(2-aminoethyl)amin (TREN) ist ein weiteres geeignetes Gerüst für die Synthese von Templat-CTHs (Abbildung 2.9 (D)).^{87,92} Das TREN-Molekül ist eine flexibel, tripodale Struktur mit drei Aminoethylgruppen. Das TREN-(suc-OH)₃-Templat wird hergestellt, indem TRENS an monobenzyliertes Succinat gekuppelt wird und die Benzylestergruppen durch Hydrierung entfernt werden. Die Bernsteinsäuregruppen erweitern die Flexibilität des Gerüsts und stellen terminale Carboxylate zur Anlagerung von Peptidketten bereit. Zudem besitzt das auf TREN basierende Templat den Vorteil, dass das tertiäre Aminzentrum der TREN-Struktur derivatisiert werden kann, um über Komplexbildung oder Quarternisierung strukturelle Anordnungen zu bilden. Dass die Flexibilität der Template eine

wichtige Rolle spielt und daraus eine stabilere CTH resultieren kann, zeigen die Schmelztemperaturen (T_m) von KTA-(Gly-[Gly-Nleu-Pro]₆-NH₂)₃, verglichen mit TREN-(suc-[Gly-Nleu-Pro]₆-NH₂)₃. Das TREN-(Pep)₃ weist eine deutlich höhere Schmelztemperatur von 46 °C auf, verglichen mit der des KTA-(Pep)₃ von 36 °C.^{87,90} Weitere Beispiele für Template sind das kegelförmige CVT (Abbildung 2.9 (E))⁸⁸ oder ein makrocyclisches Gerüst, welches zu einer Klasse von 18-gliedrigen cyclischen Hydropyranoligoliden mit alternierenden Ester- und Etherbindungen gehört. In diesem Gerüst bilden drei Ligand-Bindungsstellen auf einer Seite ein gleichseitiges Dreieck.⁹³ Die Verwendung von Kohlenhydraten als mögliche Template ist eine weitere Strategie für das De-novo-Design von tripel-helikalen Peptiden. Kohlenhydrate sind multifunktionale Moleküle mit vergleichbarer Steifheit der Ringformen. Die regioselektive Manipulation funktioneller Gruppen ist leicht möglich, ebenso wie der Zugang zu Mono- und Disaccharid-Stereoisomeren. Die primäre und sekundäre Hydroxylgruppe von Mono- und Disacchariden ermöglichen eine flexiblere Steuerung der Richtungsabhängigkeit und der Abstände zwischen den Anknüpfungspunkten der Peptidketten. Diese Carbopeptidstrategie beginnt mit der Aminoxyacetyl (Aoa)-Funktionalisierung des Methyl- α -D-Galactopyranose (d-Galp)-Derivats, um Templatmoleküle zu erhalten, gefolgt von einer C-terminalen Peptidaldehyd-Kopplung an das Templat über Oximbildung.^{94,95} Es wurden aber auch Metallionen wie z. B. Ni²⁺ Fe²⁺ als Template in Konjugation mit Aminosäuren oder N-terminalen Pyridyl- oder Bipyridyl-Funktionalitäten (bpy) verwendet, um Peptidstränge miteinander zu verknüpfen (Abbildung 2.9 (B)).^{84,96,97} Das von Kinberger *et al.*⁹⁸ entwickelte Templat basiert z. B. auf dem TREN-Templat und enthält C-terminal einen Hydroxamsäurerest als Bindungsdomäne für Fe^{III}.

In jüngerer Zeit wurde die „[2+1]-Strang-Klick-Synthese“ zur Synthese diskreter homo- und heterotrimerischer, dreifach-helikaler Peptide verwendet, wobei die C-Termini der Peptide, unter Verwendung der Huisgen-Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloadditionsreaktion, chemisch angebunden werden. Die „[2+1]-Strang-Klick-Synthese“ erfordert ein zweisträngiges, verzweigtes Peptids mit einem C-terminalen 6-Azidlysin-Rest, welcher mit (2S)-Propargylglycinamid reagiert, der am C-Terminus einsträngiger Peptide gebunden ist.⁹⁹ Die Einführung von funktionellen Gruppen kann einerseits zur Bindung an Templatgerüste verwendet werden, eröffnet aber auch die Möglichkeiten einer Steuerung der Kollagen-Tripel-Helix. Diese und weitere Möglichkeiten der gezielten Steuerung werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.3 (An)Schaltung der Kollagen-Dreifachhelix

Der Einbau funktionaler Gruppen in der Seitenkette von CMPs ist eine große Herausforderung, da garantiert werden muss, dass die Bildung der Tripelhelix nicht beeinträchtigt wird. Dies wurde, wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 2.1.1) ausgenutzt, um die Faktoren, welche die Helixbildung beeinflussen, genauer zu untersuchen.⁴² Es eröffnet aber auch weitere Möglichkeiten, wie den Einbau von z. B. „click“ Modifikationen, was eine weitere Funktionalisierung erleichtern kann.^{100,101} Optionen zur Funktionalisierung können aber ebenso gezielt eingesetzt werden, um die Helixbildung zu steuern. Somit kann die Faltung der Kollagen-Tripelhelix nicht nur durch Assoziation der Stränge mit Templaten ausgelöst werden, sondern auch durch die Neigung der Peptidstränge selbst helikale Strukturen auszubilden. Beispielsweise die photo-getriggerte Faltung durch *cis-trans*-Photoisomerisierung einer Azobenzolgruppe, die intramolekular an die kollagenmimetischen Peptide gebunden ist.^{102,103} Eine andere Möglichkeit ist die Installation einer *ortho*-Nitrobenzylgruppe am Amidstickstoff eines Glycinrests, was die Bildung der Tripelhelix verhindert. Bei Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm) konnte die *ortho*-Nitrobenzyl-Photo-Schutzgruppe gespalten werden und ermöglichte die Selbstorganisation zu einer Dreifachhelix.¹⁰⁴ Ein aktuelles Beispiel ist die Phosphorylierung, wie Acevedo-Jake *et al.*¹⁰⁵ vorstellten. Sie untersuchten die Veränderung der Stabilität und Struktur, die sich bei der Phosphorylierung von CMPs ergeben. Zusätzlich wurde die Bildung paarweiser Wechselwirkungen zwischen phosphorylierten Resten und Lysin untersucht. In allen getesteten Fällen erhöhte die Phosphorylierung die Helixstabilität. Weitere Kontrolle über die Helixstabilität konnte mit einer Änderung des pH-Wertes erzielt werden, wozu mehrere Ansätze verfolgt wurden. So berichteten Lee *et al.*¹⁰⁶ über eine pH-responsive CTH durch Einbau einer Carboxylfunktionalität über *O*-Alkylierungin des Hyp-Rests. Das Ersetzen aller Hyp-Reste von (ProHypGly)₇ durch *O*-alkylierte Aminosäuren führte zur Bildung pH-gesteuerter CTHs. Dieses Polypeptid kann sich unter sauren Bedingungen zu einer Tripelhelix zusammenfügen und sich zu einer einzelnen Peptidkette entfalten, wenn der pH-Wert erhöht wird.¹⁰⁶ Chen *et al.*¹⁰⁷ brachten Glutaminsäurereste in CMPs ein. Die Tripelhelix-Stabilität der modifizierten Peptide beruht auf der Existenz von Interstrang-Wechselwirkungen zwischen Hydroxyprolinen und Glutaminsäureresten, die über pH-Wert Änderung gesteuert werden können.¹⁰⁷ Einen interessanten Ansatz verfolgten Siebler *et al.*¹⁰⁸ mit der Möglichkeit die

Ringkonformation und somit die Helixstabilität zu variieren. (4*S*)-Aminoprolin wurde als pH-empfindliche Sonde zur Einstellung der Konformationseigenschaften der CMPs eingeführt. Diese erlaubte das pH-abhängige Umschalten der Ringkonformation, als auch die Ausbildung von transannularen H-Brückenbindungen, wodurch sich die Formierung der Kollagen-Dreifachhelix reversibel ein-und ausschalten ließ.¹⁰⁸ Es wurde somit eine Vielzahl von Methoden beschrieben, die geeignete Mechanismen bereitstellen, um eine gesteuerte Strukturbildung zu ermöglichen. Ein Blick auf die Peptidchemie liefert aber noch weitere Möglichkeiten Peptidaggregation zu unterdrücken. Ein prominentes Beispiel sind die *O*-Acyl-Isopeptide, auch DEPSI-Peptide genannt.

2.3.1 DEPSI-Peptide zur Steuerung der Peptidstruktur

Die Aggregation von Peptiden stellt vor allem bei der Synthese schwieriger Sequenzen ein Problem dar. Es wurden Strategien entwickelt, die während der Synthese zur Reduzierung des Aggregationspotentials des wachsenden Peptids beitragen sollen. Haack und Mutter¹⁰⁹ entwickelten z. B. sogenannte Pseudoprolin (ψ Pro), die durch eine *cis*-Amidbindung einen "Knick" in der Peptidkette erzeugen. Der Knick beugt der Entstehung von β -Faltblatt- und α -Helixstrukturen vor.^{109–112} Eine weitere Möglichkeit die Aggregation zu unterdrücken sind *O*-Acyl-Isopeptide. Diese DEPSI-Peptide bestehen aus einem *N*-Boc-geschützten Ser- oder Thr-Rest, wobei die nächste Aminosäure jeweils über die Hydroxylgruppe gebunden wird. Das DEPSI-Peptid weist, ähnlich der Pseudoprolin, einen Knick auf. Dieser bleibt auch nach Behandlung mit TFA bestehen (siehe Abbildung 2.10 (**1**)). Der Knick und die zusätzliche Aminogruppe sorgen zudem für eine verbesserte Löslichkeit, was die Aufreinigung vereinfacht. Eine Anpassung des pH-Wertes auf ≥ 7.4 führt zu einem *O*→*N*-Acyltransfer (**2**) und somit zum Erhalt des nativen Peptids (**3**). Die Strategie wurde von Sohma *et al.*¹¹³ mit einer Veresterung auf dem Synthescharz vorgestellt und durch Yoshiya *et al.*¹¹⁴ durch die Kupplung von *O*-Acyl-Isopeptid-Dipeptiden etabliert.

Filip und Cavalier¹¹⁵ schlugen eine einheitliche Nomenklatur für DEPSI Segmente vor und markierten einen entschützten DEPSI Ester mit $\psi(\text{CO-O})$. Ein DEPSI Segment zwischen Gly und Ser wird im entschützten Zustand als -Gly(ψ)Ser- (**1**) bezeichnet. Liegt die Hydroxylgruppe des Serins z. B. Boc-geschützt vor, ist die Bezeichnung -Gly(Boc)Ser-.¹¹⁵

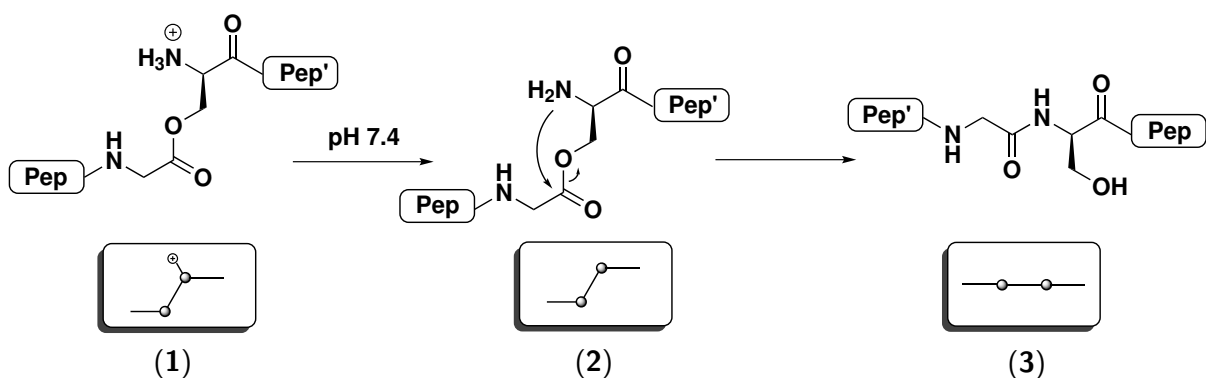


Abbildung 2.10. Mechanismus der DEPSI Schaltung anhand des DEPSI Segments Gly(ψ)Ser. Nach Abspaltung der Schutzgruppe und unter $\text{pH} \leq 5.5$ bleibt der DEPSI-Ester stabil (**1**). Die Änderung des pH Wertes auf ≥ 7.4 löst einen $O \rightarrow N$ Acyltransfer (**2**) aus und führt zur Bildung einer nativen Peptidbindung zwischen Gly und Ser (**3**).

Die *O*-Acylisopeptide (DEPSI) Segmente, die auch als „Schalterpeptide“ bezeichnet werden, bieten interessante Möglichkeiten zur Aktivierung der Selbstorganisation von Peptiden. Dies wurde z. B. von Hentschel *et al.*¹¹⁶ für Peptide mit hohen β -Faltblatt-Neigungen gezeigt. Mutter *et al.*,¹¹⁷ Carpino *et al.*¹¹⁸ und Kiso *et al.*¹¹⁹ bestätigten unabhängig voneinander die Effizienz der „Schalterpeptide“. Das Verfahren verbesserte beispielsweise die Synthese von A β 1-42-Amyloid-Aggregator-Sequenzen¹¹⁸ und ermöglichte die Ausbildung hierarchisch strukturierter Nanofasern, indem die Selbstorganisationsprozesse von Peptid-Polymer-Konjugaten in Wasser oder organischen Lösungsmitteln aktiviert wurden. Daher bieten Schaltsegmente vielversprechende Möglichkeiten als nützliche Werkzeuge zur Steuerung der Kollagen-Tripel-Helix-Bildung von kollagen-artigen Peptiden.

2.4 Native chemische Ligation

Strategien wie der Einsatz von Pseudoprolin oder DEPSI Segmenten werden meist in der linearen Peptidsynthese eingesetzt, um die Ausbeuten zu erhöhen. Neben der linearen Peptidsynthese wurde die konvergente Peptidsynthese entwickelt und optimiert, um Proteine möglichst effektiv synthetisch herzustellen. Wieland *et al.*¹²⁰ beschrieben bereits 1953 die chemoselektive Verknüpfung von Aminosäurethioestern und Cystein, aber erst 1994 wurde dieses Konzept von Dawson *et al.*¹²¹ auf ungeschützte Peptide angewendet und seit dem als native chemische Ligation (*native chemical ligation*, NCL) bezeichnet. Bei dieser Ligation, die zur Synthese von Proteinen entwickelt wurde, werden *C*-terminale α -Peptidthioester und *N*-terminale Cysteinylopeptide, unter der Bildung einer nativen Amidbindung, miteinander verknüpft. Die Reaktion besteht aus zwei Schritten. Zunächst findet, durch den Angriff der Thiolgruppe des Cysteins (**4**) an den *C*-terminalen Thioester (**5**), ein reversibler Thiolaustausch statt (Abbildung 2.11). Anschließend erfolgt ein intramolekularer $S \rightarrow N$ -Acyltransfer, welcher zur Bildung der thermodynamisch stabileren Amidbindung führt. Diese Reaktion zur Verknüpfung von *C*-terminalen Thioestern und

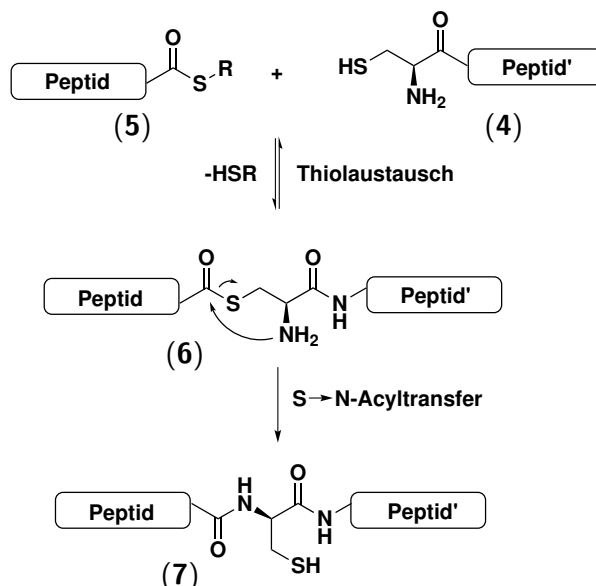


Abbildung 2.11. Mechanismus der nativen chemischen Ligation (NCL). Im ersten Reaktionsschritt findet zunächst ein reversibler Thiolaustausch zwischen einem *C*-terminalem Thioester (**5**) und einem *N*-terminalen Cystein des Peptides (**4**) statt. Anschließend erfolgt ein $S \rightarrow N$ -Acylshift, indem innerhalb des Intermediats (**6**) das Amin des Cysteins den Thioester angreift. Das Produkt dieser Umlagerung ist eine natürliche Amidbindung (**7**).

N-terminalen Cysteiny-Peptiden ist äußerst robust, chemoselektiv, schnell und kann in wässrigen Medien bei neutralem pH mit hohen Ausbeuten durchgeführt werden. Die am häufigsten verwendeten Thiolkatalysatoren bestehen entweder aus einem Gemisch aus Thiophenol und Benzylmercaptan oder dem Alkanthiol 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MesNa).^{122,123} Dennoch sind die Ligationsbedingungen und verwendeten Thioester ein Feld aktueller Forschung und unterliegen stetiger Verbesserungen.¹²⁴ Paramonov *et al.*¹²⁵ setzten die Effektivität der nativen chemischen Ligation ein, um hochmolekulare kollagenartige Peptide zu bilden. Dabei wurde die definierte Peptidsequenz allerdings nicht in monodispersen Strängen arrangiert.¹²⁵

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Konzept

Die gezielte Ausbildung der Kollagen-Tripelhelix wurde in den letzten Jahren verstärkt erforscht und eine Vielzahl unterschiedlicher Strategien entwickelt, die eine definierte Zusammenführung von drei Peptideinzelsträngen ermöglicht (siehe Abschnitt 2.2). In dieser Arbeit werden zwei Konzepte untersucht, um gezielt die Ausbildung kollagenartiger Peptiden in eine Kollagen-Dreifachhelix zu steuern. Dabei handelt es sich zum einen um die Anbindung dreier Peptidstränge an ein Templat mittels nativer chemischer Ligation und zum anderen um die oxidative Verknüpfung von Peptidsträngen über multiple Disulfidbrücken.

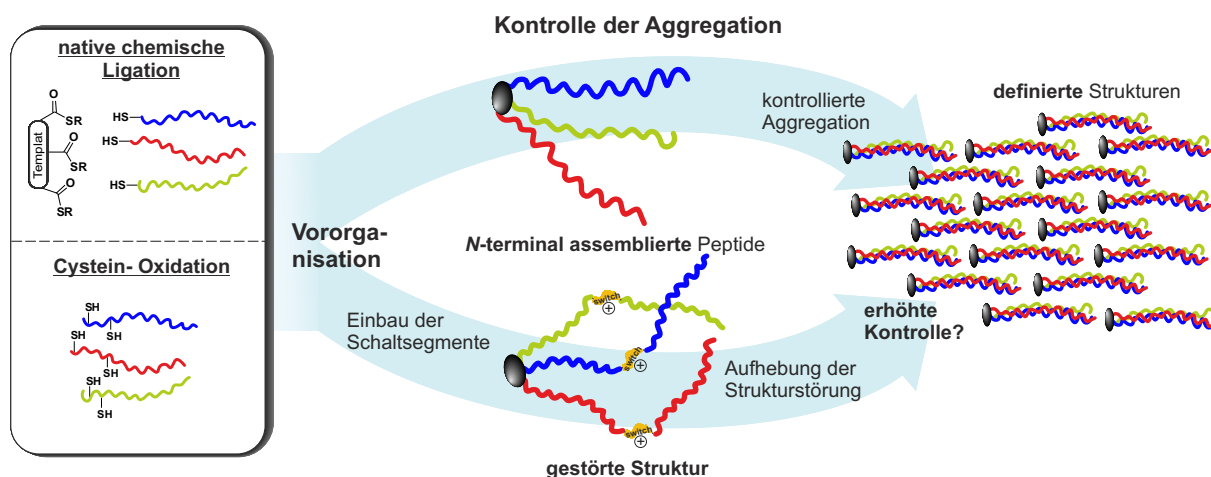


Abbildung 3.1. Konzept zur Steuerung von kollagenartigen Peptiden in geordnete dreifachhelikale Strukturen. Vororganisation unter Verwendung von nativer chemischer Ligation und Cystein-Oxidation in Zusammenhang mit pH-schaltbaren Segmenten.

Diese Techniken werden bezüglich der Eigenschaften eine Vororganisation von Peptiden herbeizuführen untersucht. Beide Strategien sollten zudem auf die Praktikabilität in Zusammenhang mit schaltbaren DEPSI Segmenten betrachtet werden, welche zusätzlich eine verbesserte Steuerung der Bildung der Kollagen-Dreifachhelix erlauben sollten. Obwohl die chemische Synthese kollagen-artiger Peptide mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS) einen Einbau von hydroxylierten Aminosäuren wie Hydroxyprolin erlaubt, wurde in dieser Arbeit hauptsächlich eine Wiederholungstriade von [Gly-Pro-Pro] verwendet. Dies ermöglicht eine systematische Vergleichbar-

keit der unterschiedlichen Systeme, da im Laufe der Arbeit unter anderem Peptide untersucht werden sollten, die über rekombinante Synthese hergestellt wurden. Auf diese Art produzierte Peptide enthalten Prolin. Der Einbau von Hydroxyprolin ist lediglich mit einem erhöhten Aufwand möglich. (siehe Abschnitt 2.1.2).

3.1.1 Organotemplat-Strategie

Zur Festlegung einer effektiven Synthesestrategie von TEMPLAT-Peptid-Konstrukten erfolgte zunächst eine Auswahl und Evaluierung geeigneter Ligationsstrategien. Diese wurden anhand eines niedermolekularen Modellsystems getestet. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die Kupplungsreaktion auch auf höher-molekulare, biotechnologisch hergestellte Peptideinzelstränge übertragbar sein sollte. Aus diesem Grund wurde der Fokus auf Thioleffunktionalitäten gelegt, da diese über Cystein-Reste in die Peptidstruktur eingebaut werden können.

Für die Organo-Templatstrategie wurden zunächst die Maleinimid-Thiol Kupplung und die native chemische Ligation (NCL) als Kupplungsreaktionen in die engere Auswahl einbezogen. Hierfür wurden Template ausgehend von dem trivalenten Tris(2-aminoethyl)amin Grundbaustein dargestellt. Dieser Baustein wurde bereits erfolgreich für die Organisation kollagenartiger Peptiden verwendet (Abschnitt 2.2.4). Erste Vorversuche zur Evaluierung der Systeme erfolgte anhand der Ligation eines 4mer Testpeptids Cys-Ser-Ser-Arg. Die hohe Instabilität der Maleinimid-Gruppen gegenüber Hydrolyse, stellt einen Nachteil dieser Ligation dar.^{126,127} Des weiteren resultiert diese Ligation in einem „Knick“ der Peptidkette, was sich negativ auf die Strukturbildung der Peptide auswirken könnte.

Während der nativen chemischen Ligation bildet sich hingegen eine native Peptidbindung. Aus diesen Gründen wurde im folgenden Verlauf des Projektes für die Organo-Templatstrategie die native chemische Ligation verwendet. Die Ligationsbedingungen sollten mittels Variation verschiedenster Parameter optimiert werden, wobei vorgreifend auf die biotechnologisch hergestellten Peptide auch der Einfluss verschiedener Denaturierungsmittel wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), Guanidinhydrochlorid betrachtet werden sollten. Zudem sollten Effekte der Reaktionsbedingungen wie z.B. Temperatur, Peptidkonzentration etc. und deren Auswirkung auf die Bildung des erwünschten Trimer-Produktes (TEMPLAT-(Peptid)₃) untersucht werden. Dabei

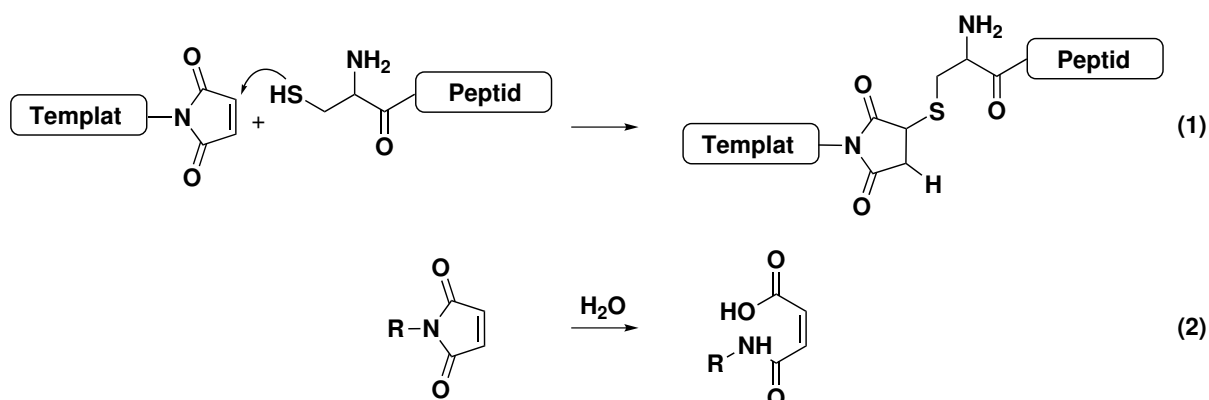


Abbildung 3.2. Exemplarische Darstellung des Maleinimid-Thiol Kupplungsmechanismus zwischen Templat und Peptid. Die Maleinimidfunktionalität befindet sich auf der Seite des Templates und die Thiolfunktionalität *N*-terminal an den zu bindenden Peptiden (Reaktion 1). Maleinimidgruppen können in wässriger Umgebung zu Maleamidsäure hydrolysieren, welche gegenüber Thiolgruppen unreaktiv ist (Reaktion 2).¹²⁷

steht die Bezeichnung TEMPLAT-(Peptid)₃ für den Templatkern an dessen drei Arme jeweils ein Peptid gebunden ist. Kollagenartige Testpeptide wie C[GPP]₃ und C[GPP]₇ wurden für die Versuche über Festphasensynthese synthetisiert und die Effektivität der Kupplung an die Template untersucht. Zudem wurden verschiedene Zusätze, die die Umesterung beeinflussen und so die Reaktivität des primären Thioesters erhöhen, untersucht. Die Optimierung dieses Systems wird im nächsten Kapitel beschrieben.

3.2 Native Chemische Ligation

Das Potenzial der nativen chemischen Ligation (NCL), zum Aufbau von Peptiden und Proteinen wurde bereits hinlänglich beschrieben, und stellte einen Meilenstein in der Peptidchemie dar (siehe Abschnitt 2.4). Sie ist eine selektive und robuste Ligationsmethodik, welche eine Vielzahl an Funktionalität toleriert. Der erfolgreiche Einsatz der NCL zur Herstellung von kollagenartigen Peptiden (CMP, engl. *collagen mimetic peptides*) wurde z.B. von Paramonov *et al.*¹²⁵ beschrieben, allerdings wurde diese Technik zur Ligation von drei kollagen-artigen Peptiden an ein Templatmolekül noch nicht herangezogen. Die hohe Selektivität der NCL macht sie zu einem ausgezeichneten Kandidaten mehrere Peptidstränge an ein Templatmolekül zusammen zu führen. Das vorgestellte Konzept ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.

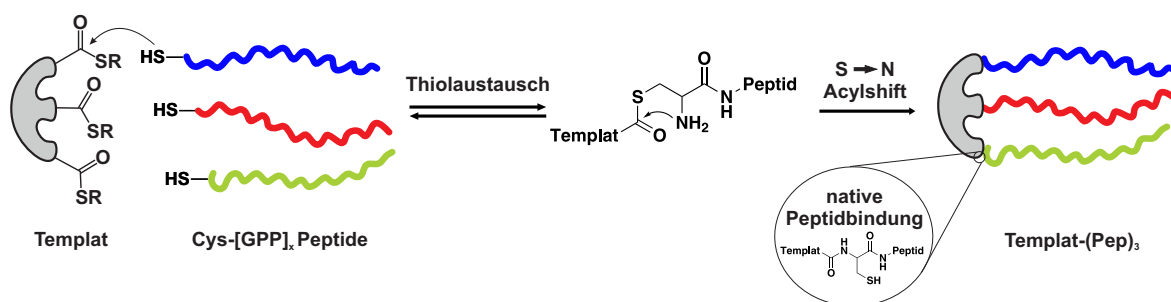


Abbildung 3.3. Schematische Übersicht der nativen chemischen Ligation dreier Cys[GPP]_x Peptidstränge an ein Trägertemplatmolekül, sowie Ablauf der Umesterung und Bildung nativer Peptidbindungen an der Ligrationsdomäne.

Für eine erfolgreiche Ausführung dieser Ligation sind an die Reaktanden traditionell zweierlei Anforderungen gestellt: zum einen wird eine Thiol- und zum anderen eine Thioesterfunktionalität benötigt (siehe Kapitel 2.4). Die Thiolfunktionalität kann z. B. leicht durch die Aminosäure Cystein in die Peptidstruktur eingebracht werden, allerdings ist es für die NCL notwendig, dass es sich hierbei um eine *N*-terminale Thiolgruppe handelt. Wird die Thiolfunktionalität auf der Peptidseite untergebracht, muss die Thioesterfunktionalität auf der Seite des Templats lokalisiert sein. Wie von Mutter *et al.*¹²⁸ und Kwak *et al.*⁸⁷ beschrieben, ist eine definierte Struktur des Templats mit gewisser konformativer Flexibilität, die einen Versatz der Peptidstränge erlaubt, essentiell für die Ausbildung der Kollagen-Dreifachhelix. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit von Templatstrukturen ausgegangen, die von Kwak *et al.*⁸⁷ beschrieben wurden. Im Kern tragen diese Gerüste eine flexible dreiarmlige Struktur mit drei Aminoethylgruppen.

3.2.1 Synthese des Templates der 1. Generation (TG^{1st})

Es wurde eine Synthese entwickelt, in der an die Tris(2-aminoethyl)amin (TREN) Basisstruktur die benötigten Thioesterfunktionalitäten angebracht werden. In einer dreistufigen Synthese wurde zunächst aus Bernsteinsäureanhydrid (**8**) und Benzylmercaptan (**9**) das *S*-Benzylthiosuccinat (**10**) hergestellt. Dieses wurde anschließend mittels Chlorameisensäureisobutylester (**11**) in ein gemischtes Anhydrid (**12**) überführt. Diese Aktivierung erlaubte die finale Umsetzung mit TREN (**13**) zum NCL-Templat der ersten Generation (TG^{1st}) (**14**).

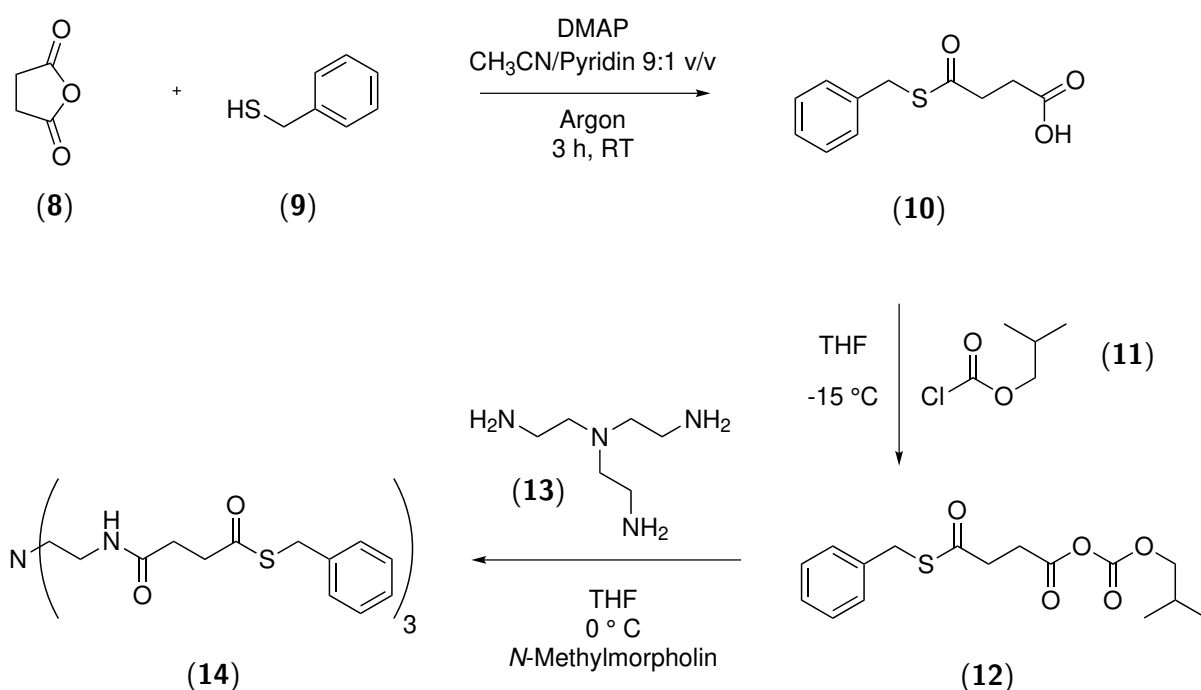


Abbildung 3.4. Schematische Übersicht der Synthese des NCL-Templates der ersten Generation TG^{1st} (**14**).

Diese Syntheserouten wurden ausdrücklich so gewählt, dass eine aufwendige Aufarbeitung vermieden wurde. Entscheidender Schritt in dieser Synthese war die Bildung des gemischten Anhydrids (**12**), welches leicht mit Tris(2-aminoethyl)amin (TREN (**13**)) in das finale Produkt TREN-(suc-OSBzl)₃ (**14**) (im Folgenden als TG^{1st}) überführt werden konnte. Die Triebkraft dieser Reaktion ist die Freisetzung von CO₂, wodurch zusätzlich die Aufarbeitung minimiert wird, da das entstehende Nebenprodukt leicht zu entfernen war. Zudem konnte durch diese Synthese die Bildung von einarmigen oder zweiarmigen Nebenprodukten minimiert werden. Die

entwickelte Syntheseroute weißt eindeutige Vorteile gegenüber der von Kwak *et al.*⁸⁷ beschriebenen Synthese auf, da die Verwendung von Schutzgruppenchemie und aufwendige säulenchromatografische Aufreinigung vermieden werden konnte.

3.2.2 Optimierung der Ligationsbedingungen

In der Literatur wurden für die Native chemische Ligation bereits eine Vielzahl von unterschiedlichen Reaktionsbedingungen beschrieben.¹²² So werden Additive wie z. B. Dithiothreitol (DTT) oder Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) hinzugefügt, um die Bildung von Disulfiden zu unterdrücken. Weitere Zusätze wie die Thiole Natrium-2-sulfanylethansulfonat (MesNa), Benzylmercaptan oder Thiophenol werden zudem für die Erhaltung einer reduzierenden Umgebung eingesetzt. Des weiteren erhöhen diese Zusätze die Reaktivität der gebildeten Peptidthioester.¹²² Üblicherweise wurde hierbei allerdings die Ligation von zwei Peptiden beschrieben. Die Ligation von einem Templat, welches den Ankerpunkt für jeweils drei Peptidstränge bildet, stellt weitere Herausforderungen an die Reaktionsbedingungen. In diesem Abschnitt werden diese Herausforderungen dargelegt und entsprechende Lösungsansätze diskutiert. Erste Versuche sollten die Tauglichkeit des TG^{1st} bezüglich der nativen chemischen Ligation prüfen. Die unterschiedlichen Bedingungen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1. Native chemische Ligation des TG^{1st} mit C[GPP]₇ bei verschiedenen Bedingungen.

	Puffer [mM]	pH	TG ^{1st} [Äq.]	C[GPP] ₇ [Äq.]	DTT [mM]	DMSO [%]	Gdn [M]	T [°C]
Lig1	100	7.4	1	3.5	3.5	10	/	RT
Lig2	100	7.4	1	3.5	20	10	3	60
Lig3	100	7.4	1	14	20	10	3	60

Das Peptid mit der Sequenz C[GPP]₇ wurde mittels SPPS an einem Tentagel-SRAM Harz synthetisiert. Es weißt *N*-terminal die erforderliche Thiol-Funktionalität auf und stellt den Ligationspartner zu dem dreiarmligen Thioester-Templat TG^{1st} (**14**) dar. Die siebenfache Wiederholung des GPP-Tripletts sollte eine ausreichende Länge für erfolgreiche Ausbildung der kollagenartigen Dreifachhelix in Kombination mit Assemblierungstechniken darstellen und bot somit

einen verlässlichen Ausgangspunkt für erste Untersuchungen. So zeigten z.B. Li *et al.*¹²⁹ oder Kwak *et al.*⁸⁷ die Helixbildung von Templatgebundenen [Gly-Xaa-Yaa]₆ Peptiden. Dithiothreitol (DTT) wurde als Zusatz verwendet, um eine reduzierende Umgebung sicherzustellen. Eine Reaktionstemperatur von 60 °C und die Zusätze von Dimethylsulfoxid (DMSO), als auch Guanidinhydrochlorid (Gdn·HCl) sollten die Denaturierung und Flexibilität der Peptide garantieren und so vorzeitiges Assoziieren von Einzelsträngen. Zudem ist in DMSO das Templat besser löslich, was die Handhabbarkeit erleichtert. Es sollte zunächst mittels MALDI-TOF-MS ein qualitativer Nachweis des Produktes erfolgen (Ligation dreier Peptide an ein Templatmolekül). Der Ligationsansatz **Lig1** mit einem Templat/Peptidverhältnis 1:3.5 unter Raumtemperatur zeigte nach 1 h Reaktionszeit keine Bildung des Produktes. Hingegen zeigte die Analyse des Ansatzes **Lig2** nach 30 min die Bildung des Produktes und für den Ansatz **Lig3** konnte bereits nach Reaktionsstart das Produkt nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.6.2). Obwohl eine quantitative Analyse der Ligationsansätze nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, zeigte der qualitative Nachweis bereits die Relevanz entsprechender Denaturierungsmittel. Die Bildung des Produktes bei Ansatz **Lig2** lässt sich vermutlich auf diese Tatsache zurückführen. Für den Ansatz **Lig3** wurde wiederum das Templat/Peptidverhältnis auf 1:14 erhöht. Dieser Überschuss drückt das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des gewünschten Produkts und ermöglicht somit einen schnelleren Ablauf der Reaktion. Es ist aber anzumerken, dass ein verstärkter Peptidüberschuss hinsichtlich möglichst definierter Dreifachhelixbildung der kollagenartigen Peptide (CMPs) nicht wünschenswert ist. Da nicht alle Peptideinzelstränge an ein Templat gebunden werden und somit keine definierte Vororganisation erfolgen kann. Zudem können diese Einzelstränge, wie bereits erwähnt, zu verzweigter Assoziation führen wodurch die gezielte Aufreinigung erschwert wird.

NCL-Katalyse durch 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium

Die Reversibilität des Thiolaustausches, welche den ersten Schritt der nativen chemischen Ligation darstellt (Abb. 3.3), erlaubt die Verwendung von Thiolen, wie z. B. 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MesNa), als Katalysatoren dieser Reaktion. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt, kann MesNa im ersten Reaktionsschritt einen vorgelagerten exogenen Thiolaustausch herbeiführen und somit die Bildung von aktiveren Thioestern unterstützen, was die Kinetik der Reaktion

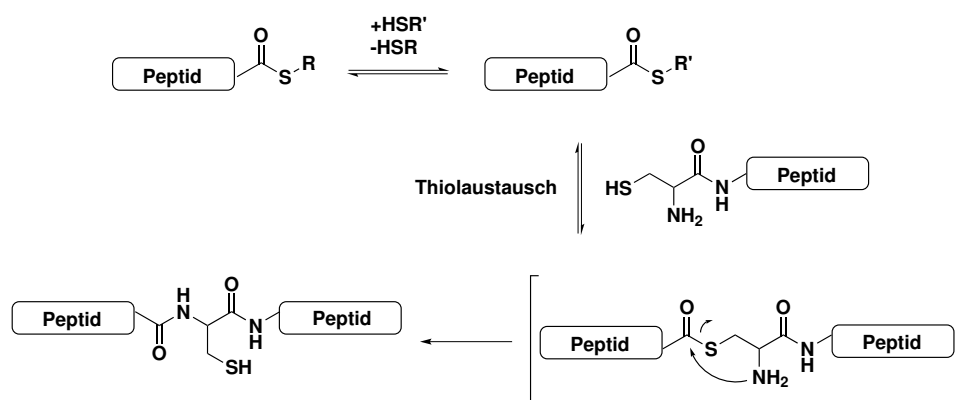


Abbildung 3.5. Mechanismus der nativen chemischen Ligation mit exogenem Thiol-Thioesteraustausch (Schritt 1), Beispiel anhand der Ligation zweier Peptide.

erhöht.¹³⁰ Außerdem kann ein Thiolaustausch von Thiolen mit reduzierter Reaktivität, z. B. interner Cysteinreste, rückgängig gemacht werden. Des Weiteren wird durch exogene Thiole das *N*-terminale Cys in reduzierter Form gehalten.¹²² Wie auch in Ligation **Lig2** wurde in dem Ansatz mit MesNa (**Lig3**) DTT, Guanidinhydrochlorid und eine Reaktionstemperatur von 60 °C verwendet. Um die Analytik zu vereinfachen und somit einen tieferen Einblick in den Reaktionsverlauf zu erlangen, wurden die Anforderungen an die Ligationsbedingungen herabgesetzt, indem das kürzere Peptid C[GPP]₃ für die Ligation mit dem Templat TG^{1st} verwendet wurde. Die kürzeren Peptide sollten leichtere und schnellere Zugänglichkeit von zwei und drei Peptiden an das Templat ermöglichen was zu einer verringerten Bildung von Nebenprodukten führen sollte. Zudem sollte die geringere Molekülgröße eine Auftrennung und Detektion mittels LC-MS vereinfachen. Mit dem Hintergrund einen stöchiometrischen Ligationsumsatz zu erreichen, welcher bei einem späteren Einsatz von höher molekularen [GPP]_x Strängen von Vorteil wäre, wurde bei diesen Ansätzen kein Peptidüberschuss verwendet (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2. Native chemische Ligation des TG^{1st} mit C[GPP]₃ mit MesNa und DTT.

	Puffer [mM]	pH	TG ^{1st} [Äq.]	C[GPP] ₃ [Äq.]	MesNa [mM]	DTT [mM]	DMSO [%]	Gdn [M]	T [°C]
Lig4	100	7.4	1	3.5	20	100	10	3	60

Nach einer Stunde Reaktionszeit konnten mittels UPLC-MS-Messungen verschiedenste Oxidationsprodukte detektiert und identifiziert werden. Dabei handelte es sich vor allem um Oxidationsreaktionen unter Bildung von Disulfidbrücken, wie z. B. der Reaktion zwischen dem Peptid C[GPP]₃ und MesNa (**C**). Diese Produkte waren zu erwarten, zeigen aber deutlich die Herausforderungen die mit dieser Reaktion einhergehen. So ist z. B. auch eine Oxidation des finalen Reaktionsproduktes TREN-(suc-C[GPP]₃)₃ mit 2-Mercaptoethansulfonsäure (**F**) zu finden. Nebenreaktionen dieser Art werden durch die Notwendigkeit des dreiarmligen Systems zudem noch wahrscheinlicher. Die intra- und intermolekulare Oxidation über Disulfidbrücken ist zwar theoretisch möglich, konnte in diesem Ansatz aber nicht nachgewiesen werden.

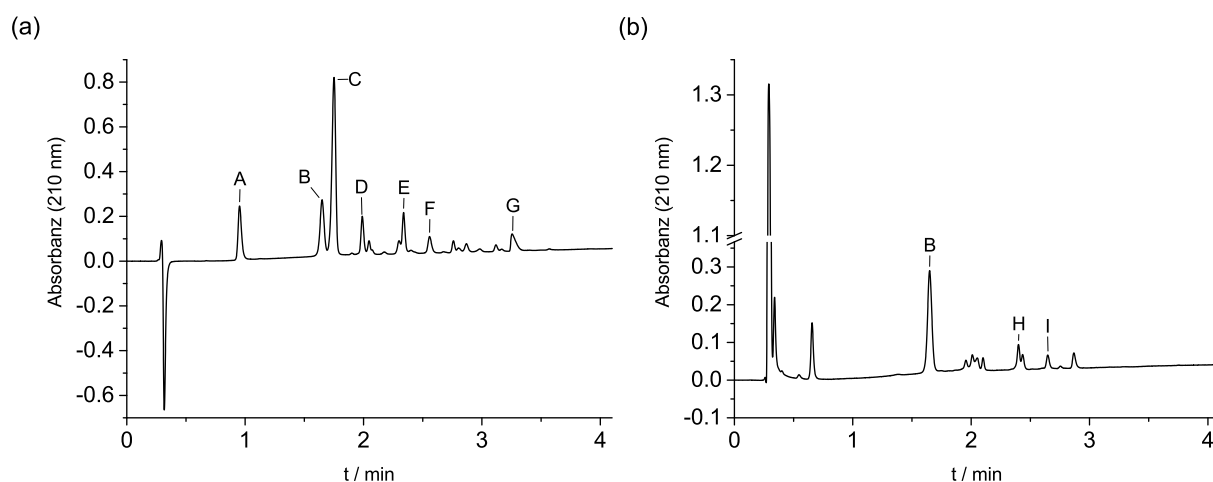


Abbildung 3.6. NCL Reaktionen von TG^{1st} und C[GPP]₃. UPLC (210 nm, 10 % B bis 40 % B, 4 min) nach (a) 1 h Reaktionszeit und (b) 12 h Reaktionszeit mit anschließender Reduktion durch TCEP. (A: Dimer der Mercaptoethansulfonsäure (Mes); B: C[GPP]₃; C: Disulfid von C[GPP]₃ und Mes; D: Dimer von C[GPP]₃; E: cyclisches Nebenprodukt von TG^{1st} und 2×C[GPP]₃; F: Disulfidoxidation des Produktes und Mes; G: keine Zuordnung möglich; H: TG^{1st} mit 2×C[GPP]₃, 1×Thioester hydrolysiert; I: Produkt: TREN-(suc-C[GPP]₃)₃).

Während nach 1 h Reaktionszeit noch reduziertes Peptid (C[GPP]₃, (**B**)) nachgewiesen werden konnte, ist nach der Reaktionskontrolle bei 2 h vornehmlich oxidiertes Peptid vorhanden (siehe Abschnitt 5.19 (**C**), Peptid-S-S-Mes). Der Abbruch der Reaktion erfolgte nach 12 h. Nach Reduktion mittels TCEP konnte über UPLC-MS das Produkt (Abb. 3.6, Produkt **I**, TREN(suc-C[GPP]₃)₃) nachgewiesen werden, bei dem an die drei Arme des Templats jeweils ein Peptid C[GPP]₃ gebunden ist. Die Oxidation der Reaktanden wie z. B. die Oxidation unter Beteiligung von MesNa unter Bildung einer Disulfidbrücke (Abb. 3.6 **A**, **C**), als auch die Oxidation des

Produkts (**I**), stellte ein Problem dieser Reaktion dar. Die Oxidation ist zwar reversibel, wie die Reaktion mit TCEP (siehe Abbildung 3.6 (b)) zeigte, allerdings würde dies einen weiteren Reaktionsschritt darstellen. Vor allem aber erfolgt die Disulfid-Oxidation am *N*-terminalen Cystein, welches für die NCL zwingend erforderlich ist und führt so zu einer Abnahme des für die Reaktion zu Verfügung stehenden Eduktes. Diese Tatsache, als auch das Aufkommen von oxidativen Nebenprodukten, könnte die geringe Bildung des Produktes erklären. Zusätzlich zu den Nebenprodukten, die durch Oxidation gebildet wurden, konnte eine weitere Nebenreaktion postuliert werden, welche im Folgenden ausführlicher beschrieben wird.

3.2.3 Problematik der intramolekularen Nebenreaktion

Erfolgt die Ligation von Peptiden ($C[GPP]_3$) an einem Templatmolekül ($TREN(suc-SBzl)_3$) kann das zweiarmige Zwischenprodukt (**15**) gebildet werden. Ausgehend von dieser Struktur könnte eine intramolekulare Reaktion eines Cysteinrests und dem Thioester des Nebenarms erfolgen (Abb. 3.7 i)). Dabei wird das cyclische Nebenprodukt (**16**) gebildet. Der Ablauf dieser

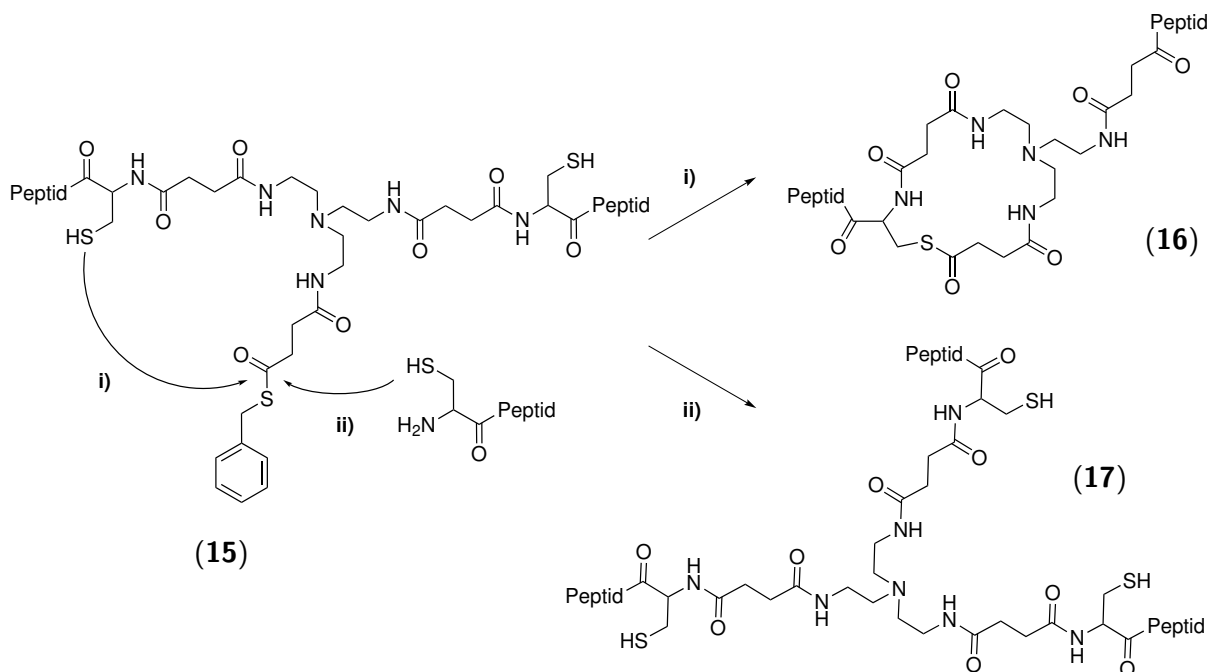


Abbildung 3.7. Schematische Darstellung der Problematik einer intramolekularen Nebenreaktion i) als konkurrierende Reaktion der nativen chemischen Ligation des Templats mit drei Cysteinyl-Peptiden ii) unter Bildung des Produktes $TREN-(suc-Peptid)_3$.

Reaktion steht in direkter Konkurrenz zu der gewünschten Reaktion **ii**) (Abbildung 3.7). Es ist hierbei wichtig anzumerken, dass die Thiolaustauschreaktion **i**) reversibel ist, (vgl. Abbildung 3.5) und durch den Einsatz von MesNa unterdrückt werden sollte. Wie zuvor erwähnt, war das Ziel des Einsatzes von MesNa die Rückbildung dieser Nebenprodukte, indem ein Angriff von MesNa an dem cyclischen Thioester erfolgt und ein reaktiver Thioester gebildet wird, der erneut für eine Ligation bereitsteht. Es ist aber anzunehmen, dass nach der Bildung des zweiarmigen Zwischenprodukts die Zugänglichkeit zum Templatkern und damit dem verbliebenen Thioester, zum einen für einen dritten Peptidstrang, als auch für MesNa erschwert ist. Die β -Thiol-Seitenkettenfunktionalität eines Cys-Restes aus einem, mit dem Templat verbundenen Peptidstrang, liegt in unmittelbarer Nähe zu der verbliebenen Thioesterfunktionalität. Ein Angriff dieses Thiols (Reaktion **i**)) wäre somit erleichtert und könnte das Gleichgewicht der Trans-Thioesterifizierung zu einem cyclischen Produkt mit reduzierter Reaktivität verschieben (siehe 3.6 (**E**)). Beispiele aus der Literatur von Hackeng *et al.*¹³¹ bestätigen diese Vermutung und zeigten auf, dass die Ligation stark von der Zugänglichkeit des C-terminalen Peptidrestes abhängt.

Es kann somit zusammengefasst werden, dass unter diesen Bedingungen zwar die Produktbildung mittels UPLC-MS nachgewiesen werden konnte, aber der Zusatz von MesNa in dieser Reaktion nur bedingt Vorteile brachte. Zum einen konnte auch durch MesNa eine postulierte cyclische Nebenreaktion nicht vollständig zurückgedrängt werden und zum anderen führen oxidative Nebenprodukte zu einer Verminderung der Produktbildung. Vor allem die Disulfidbildung zwischen dem Peptid C[GPP]₃ und MesNa sei hier erwähnt. Es war somit erstrebenswert alternative Reaktionsbedingungen für die NCL zu finden. Eine weitere Option bot die Thiolzusatz-freie-NCL unter Verwendung von Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) und Natriumascorbat.

3.2.4 NCL ohne exogene Thioladditive

Rohde *et al.*¹³² beschrieben Reaktionsbedingungen in denen Natriumascorbat und Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) als Additive eingesetzt wurden. TCEP wirkt einerseits als Reduktionsmittel und stellt so die reduzierende Umgebung sicher. Es kann aber andererseits ohne den Zusatz von exogenen Thiolen wie MesNa eine Entschwefelung von Cysteinylpeptiden hervorru-

fen. Diese Entschwefelung, in der durch Abspaltung von -SH aus Cys→Ala gebildet wird, könnte die Ausgangspeptide und die Reaktionsprodukte betreffen. Es wurde somit vermutet, dass die Thiole wie z. B. MesNa nicht nur als Reduktionsmittel wirken, sondern auch als Radikalfänger in dem sie die TCEP induzierte Entschwefelung unterdrücken. Um jedoch auf Thiole verzichten zu können wurde als Thiolalternative auf Natriumascorbat als Radikalfänger zurückgegriffen. Ascorbat ist gut wasserlöslich, geruchlos, günstig, ungiftig und bietet somit exzellente Voraussetzungen. Die TCEP induzierte Reduktion von Cys→Ala kann in der Peptidchemie gezielt eingesetzt und unter erhöhten Temperaturen zur Vollständigkeit getrieben werden.¹³³ Um in dem hier vorgestellten Ansatz diese Reaktion möglichst zu vermeiden, wurde Natriumascorbat (Na-Asc) eingesetzt. Zudem wurde die Reaktionstemperatur, verglichen mit vorherigen Reaktionen, herabgesetzt um die Bildung von Nebenreaktionen zu minimieren. Die Reaktionsbedingungen können der Tabelle 3.3 entnommen werden.

Tabelle 3.3. Native chemische Ligation des TG^{1st} mit C[GPP]₃, ohne Thioladditive.

	Puffer [mM]	pH	TG ^{1st} [Äq.]	C[GPP] ₃ [Äq.]	TCEP [mM]	Na-Ascorbat [mM]	DMSO [%]	Gdn [M]	T [°C]
Lig5	100	7.4	1	3.5	50	100	10	3	37

Die Reaktion wurde analog der Reaktion mit MesNa (Abschnitt 3.2.2) nach 12 h beendet und das Gemisch mittels UPLC-MS analysiert. Es ist anzumerken, dass bei dieser Reaktion keine Oxidation des Peptides stattgefunden hat. Die milderen Reaktionsbedingungen sorgen somit dafür, dass dieses möglichst lange für eine Ligation zur Verfügung steht. Zwischen Retentionszeiten um 1.8-2.1 min eluieren nicht identifizierbare Nebenprodukte. Dem Peak bei einer Retentionszeit von $t_R = 2.1$ min können im ESI-MS Massenspezies des zweiarmigen Produktes unter Anlagerung von TCEP zugeordnet werden (siehe Abschnitt 5.6.2). Dies deutet darauf hin, dass die Reaktion noch nicht vollständig abgelaufen ist. Es ist aber anzumerken, dass kein einarmiges Produkt gefunden werden konnte.

Es war zu beobachten, dass unter diesen Reaktionsbedingungen die intramolekulare cyclische Nebenreaktion ebenfalls auftrat ($t_R = 2.4$ min). Während das Verhältnis von cyclischen Nebenprodukt zum erwünschten Produkt unter Verwendung von MesNa und nach finaler Reduktion bei ca. 1:1 lag, konnte bei der Reaktion ohne exogene Thiole ein Nebenprodukt/Produktverhältnis

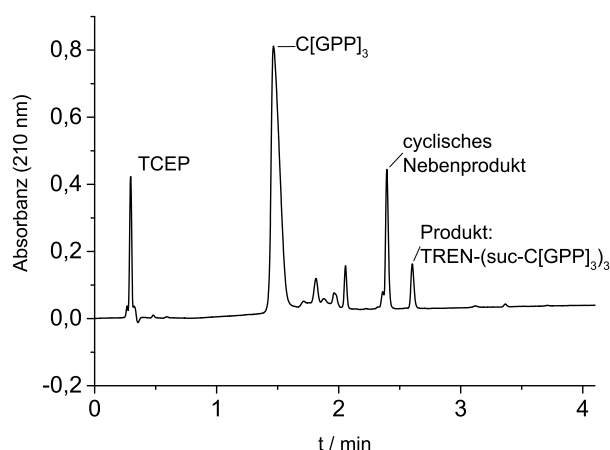


Abbildung 3.8. NCL Reaktionen von $\text{TG}^{1\text{st}}$ und C[GPP]_3 , Reaktionsbedingungen nach Tabelle 3.3, UPLC (210 nm, 10 % B bis 40 % B, 4 min) nach 12 h Reaktionszeit.

von 3:1 ermittelt werden. Diese Verschiebung der Produktanteile konnte erwartet werden, da ohne Thiolzusatz kein Thiolaustausch von Nebenprodukten erfolgen kann. Es ist jedoch anzumerken, dass bei dieser Reaktion insgesamt weniger Nebenreaktionen abgelaufen sind (vergleiche Abb. 3.6 und 3.8) und das entsprechende Produkt $\text{TREN}-(\text{suc-C[GPP]}_3)_3$ erhalten werden konnte. Es ist festzuhalten, dass eine Vielzahl an konkurrierenden Reaktionen ablaufen können. Nebenreaktionen, in Form von Oxidationen unter Bildung von Disulfidbrücken, konnten unter den, in diesem Ansatz gewählten Reaktionsbedingungen, unterdrückt werden. Zudem kann ein vorgelagerter Thiolaustausch nicht stattfinden, was theoretisch zu einem erhöhten Anteil an Fehlprodukten führen kann. Allerdings ist sowohl unter Zusatz von MesNa als auch ohne MesNa eine intramolekulare Ringbildung zu beobachten. Diese Tatsache, als auch die, dass unter beiden Bedingungen kein ein- oder zwei-armiges Produkt gefunden wurde, lässt darauf schließen, dass die Zugänglichkeit zum Templat Kern und der entsprechenden Ligationsdomäne mit Fortschreiten der Reaktion erschwert wird. Das vergleichsweise kleine Templatzentrum wird vermutlich durch bereits gebundene Peptide vermehrt abgeschirmt und somit vor allem der Zugang des dritten Peptids erschwert. Eine mögliche Lösung dieses Problems stellt die Erweiterung des Templates und somit eine Vergrößerung des Abstandes von Templatzentrum zu Ligationsdomäne dar.

3.2.5 Einfluss der Templatgröße

Bei der Vergrößerung des Templats sollte erneut Tris(2-aminoethyl)amin (TREN) die zentrale Struktur bilden. Davon ausgehend musste die Templatstruktur erweitert und eine Thioesterfunktionalität eingeführt werden. Das Ziel sollte eine möglichst effektive Erweiterung des Templats, hinsichtlich der Synthese als auch der Abschließenden Ligation sein. Zudem sollte die Erweiterung möglichst keinen negativen Einfluss auf die finale dreifach-helikale Peptidstruktur ausüben. Es war erstrebenswert die Vergrößerung so zu wählen, dass diese zur Bildung der Kollagen-Dreifachhelix beitragen kann. Daher sollte das Templat mit einem kollagenartigen Peptidmotiv der Aminosäureabfolge GPP erweitert werden. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, erfolgte zunächst die Synthese des Templatkerns TREN-(suc-OH)₃ (siehe Abschnitt 5.4.2). Über die drei Carboxylgruppen des TREN-(suc-OH)₃ sollte das Templat *C*-terminal an die, auf dem Trägerharz befindlichen, Peptide der Sequenz GPP gebunden werden.

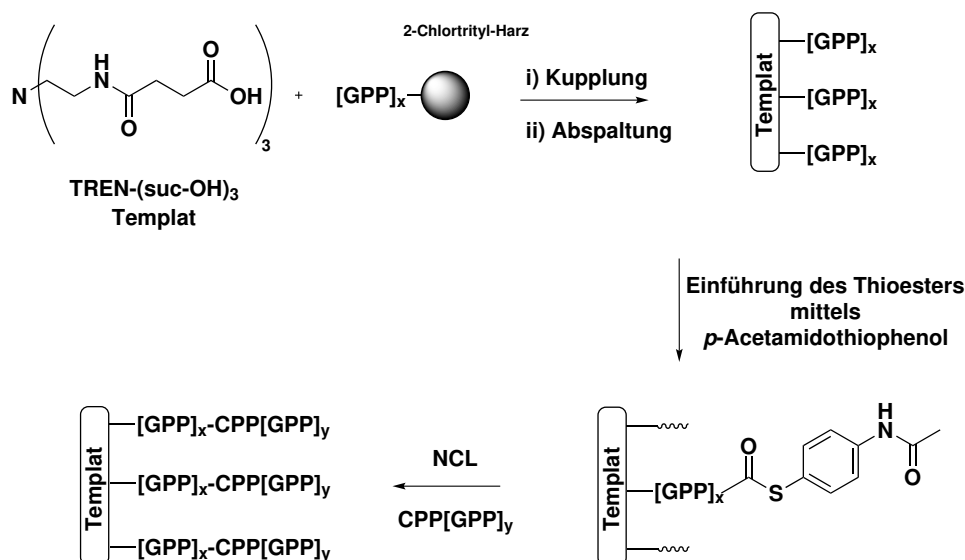


Abbildung 3.9. Konzept zur Erweiterung des Templats. Die festphasenvermittelte Kupplung von TREN-(suc-OH)₃ an [GPP]_x Peptide ermöglicht die Aufrechterhaltung des GPP Kollagenmotivs. Die für die NCL benötigte Thioesterfunktionalität wird über *p*-Acetamidothiophenol in die Struktur eingebracht. Im finalen Schritt kann die native chemische Ligation mit einem Cysteinylpeptid erfolgen.

Es wurde zuvor postuliert (siehe Abschnitt 3.2.4), dass eine geringe Größe des Templats vermutlich einen negativen Einfluss auf Ligationsumsätze hat, da freie Thiolgruppen von Cysteinresten nach Ligation weiter mit Thioestern interagieren können. Somit kann angenommen werden, dass

ein größerer Abstand vom Templatkern zur Thioesterstruktur für die Ligation von Vorteil sein sollte. Es erfolgten zunächst Untersuchungen zur Optimierung des Abstandshalters. Templaterweiterungen mit [GPP], [GPP]₃ und [GPP]₇ wurden dargestellt. Eine Erhöhung des Abstands zwischen Templat und Ligationsstelle sollte prinzipiell die Kupplung erleichtern, bedeutete aber auch Einschränkungen bezüglich des leichten synthetischen Zugangs. Zudem setzt mit Anwachsen der Peptidlänge verstärkt Aggregation und Dreifachhelixbildung ein, wodurch ein Optimum bezüglich der Peptidlänge erwartet werden kann. Die drei verschiedenen Sequenzen mit einer Länge von [GPP]_{1/3/7} wurden jeweils separat auf einem 2-Chlortritylharz synthetisiert. Die Wahl des Trägerharzes ist hier von Bedeutung, da die Peptide, nach erfolgter Synthese, mit einer C-terminalen Carboxyfunktionalität vom Trägerharz abgespalten werden. An dieser sollte später die Einführung des Thioesters, welcher für die NCL benötigt wird, erfolgen. Die Kupplung des Templats an die festphasengebundenen Abstandshalterpeptide wurde durch das Kupplungsreagenz PyBOB vermittelt und analog der Kupplung einer Aminosäure (siehe Abschnitt 5.3.5) durchgeführt. Die TREN-(suc-[GPP]_x)₃ Konstrukte wurden mittels Trifluoressigsäure (TFA) vom Trägerharz abgespalten, in kaltem Et₂O gefällt, in Reinstwasser gelöst und gefriergetrocknet. Der qualitative Nachweis der Produktbildung erfolgte mittels MALDI-TOF-MS. Für [GPP]₁ als auch [GPP]₃ konnte die Bildung des Produkts bestätigt werden. Für [GPP]₇ konnte das entsprechende Produkt TREN-(suc-[GPP]₇)₃ nicht gefunden werden. Dies ist zunächst erstaunlich, da die längeren Peptide eine höhere Flexibilität aufweisen und somit drei Peptide leichter an ein Templatmolekül binden sollten. Andererseits führen vermutlich die langen Peptide bereits zu einer sterischen Abschirmung des Templatkerns, wie bereits in vorherigen Abschnitten diskutiert. Zudem zeigt das Fmoc-Monitoring, bei dem die Absorption des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts bei 301 nm gemessen wird, das nach der Kupplung der 13 Aminosäure bei [GPP]₇ eine erschwerte Fmoc-Abspaltung erfolgt (siehe Anhang 5.39). Dies deutet darauf hin, dass ab dieser Aminosäure eine Peptidlänge erreicht wurde, bei der eine verstärkte Peptid-Peptid-Wechselwirkung oder Peptid-Faltung auftritt, wodurch der Zugang zum N-Terminus erschwert wird. Zudem weisen Erfahrungen darauf hin, dass auch Folgekupplungen erschwert ablaufen können. Somit könnte auch eine Kupplung an das Templat ab einer bestimmten Peptidlänge erschwert ablaufen. Demnach sollte eine Kupplung von 12 Aminosäuren möglich sein. Der Nachweis erfolgte mittels Synthese von TREN-(suc-GPPGPPGSPGPP)₃. Dieses Konstrukt konnte

mit präparativer HPLC aufgereinigt und mit UPLC-MS eindeutig identifiziert werden. Serin (S) wurde in die Peptide eingebaut, da an dieser Position später eine Schaltstelle eingebracht werden sollte. Diese Thematik soll im späteren Verlauf dieser Arbeit genauer behandelt werden.

Am C-Terminus der Peptide von TREN-[suc-GPPGPPGSPGPP]₃ konnte erfolgreich der Thioester eingeführt werden (vergleiche Abbildung 3.9) indem zunächst eine Aktivierung der Carboxyfunctionalitäten mittels PyBOP erfolgte. Die Reaktion wurde zuvor durch von Eggelkraut-Gottanka *et al.*¹³⁴ beschrieben. Analog zu der Synthese wurde auch in dieser Arbeit der Thioester von *p*-Acetamidothiophenol anstelle des Benzylthioesters wie in TG^{1st} verwendet. Der entsprechende Benzylthioester müsste über Benzylmercaptan in die Struktur eingebracht werden. *p*-Acetamidothiophenol besitzt gegenüber Benzylmercaptan einige Vorteile, vor allem aber ist *p*-Acetamidothiophenol weniger giftig, besser löslich in wässrigen Lösemitteln und weist einen weniger intensiven Geruch auf. Zudem ist der Thioester ausreichend stabil gegenüber sauren Bedingungen. Dies erlaubt die Entschützung mit Hilfe von TFA, sowie die chromatographische Aufarbeitung in Acetonitril/Wasser Lösemittel-Gemischen.¹³⁴ Das Produkt TREN-[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR']₃ konnte durch semipräparative HPLC aufgereinigt und über UPLC-MS charakterisiert werden (vergleiche Abbildung 3.9). Die Erweiterung des Templats, unter Aufrechterhaltung des Kollagenstrukturmotivs GPP, konnte somit erfolgreich durchgeführt werden. Der Abstand des Templat-Zentrums TREN zur Ligationsstelle wurde um die Sequenz Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Pro-Pro erweitert. Im Folgenden soll ein Vergleich der Template TG^{1st} und TG^{2nd} bezüglich einer möglichst effektiven nativen chemischen Ligation erfolgen.

3.2.6 Vergleich der Template TG^{1st} und TG^{2nd}

In diesem Abschnitt werden die NCL-Template der ersten Generation und der zweiten Generation miteinander verglichen (TG^{1st} und TG^{2nd}, vergleiche Abb. 3.10). Dies soll anhand einer nativen chemischen Ligation beschrieben werden. Dabei wurden beide Template unter den gleichen Ligationsbedingungen mit dem Cysteinylopeptid Cys-Pro-Pro-[Gly-Pro-Pro]₄ umgesetzt.

Das Peptid CPP[GPP]₄ wurde so gewählt, dass nach Ligation mit TG^{2nd} insgesamt eine „Triplett“-Wiederholung von [Gly-Xaa-Yaa]_n mit n = 9 vorlag. Ein Arm des finalen Ligations-

produktes wies damit abschließend die Aminosäureabfolge GPP-GPP-GSP-GPP-CPP[GPP]₄ auf. In dem Peptid befindet sich Serin an Sequenzposition 8. An dieser Stelle soll im Verlauf der Arbeit ein Schaltsegment eingebracht werden. Zudem liegt an Position 13 ein Gly zu Cys Austausch vor, durch den die native chemische Ligation ermöglicht wird. Es ist bekannt, dass die Pro←Cys Ligation eine Herausforderung darstellt.¹³² Dennoch hat der Gly zu Cys Austausch vermutlich einen geringeren Effekt auf die Ausbildung einer Dreifachhelix, als die Einbringung von Cystein in die Peptidsequenz, da die Sequenzabfolge von [GPP]_x nur leicht gestört wird.¹³⁵ Jedoch ist anzumerken, dass ein Austausch von Glycin aber auch Prolin in Kollagen einen maßgeblichen Einfluss auf die Kollagen-Tripelhelix (CTH) haben kann.¹⁴ Die Ligation des Templats

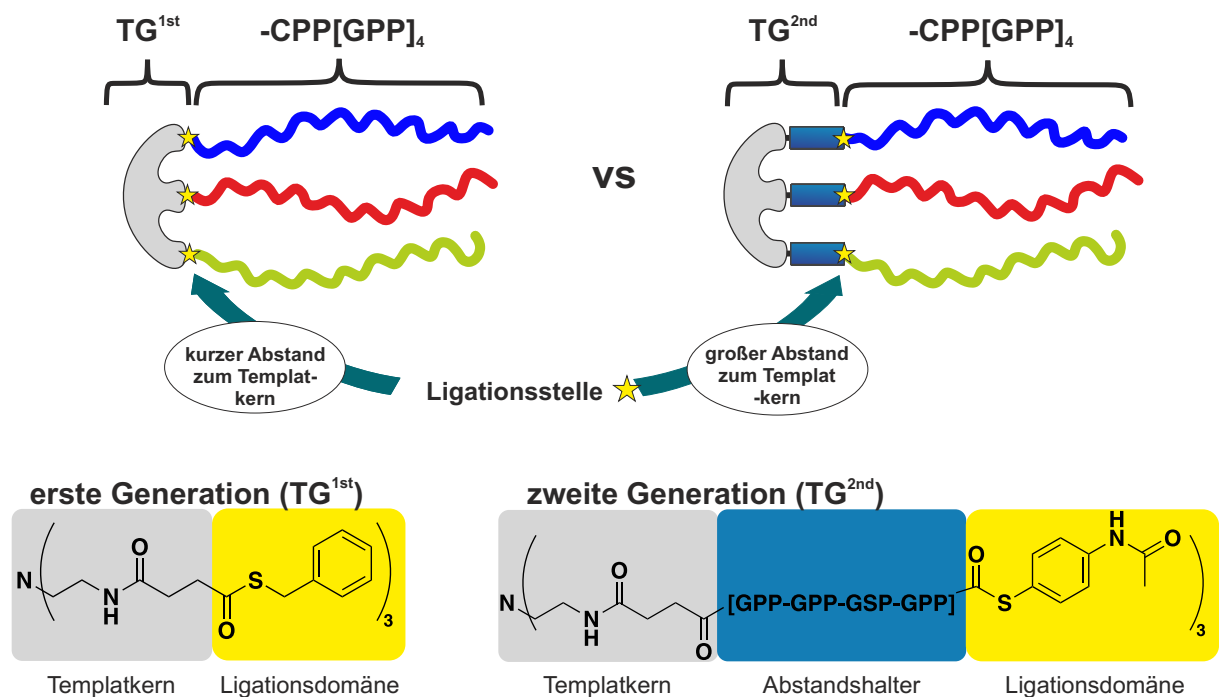


Abbildung 3.10. Entwicklung des NCL-Templats erster Generation (TG^{1st}) zur zweiten Generation (TG^{2nd}) durch Vergrößerung des Abstandes von Templatkern zur Ligationsschleife, unter Erhaltung des GPP Motivs.

der ersten Generation (TG^{1st}) soll, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, zu einer Anbindung von drei Peptidsträngen führen. Die Erweiterung des Templats zur zweiten Generation vergrößert den Templatkern (siehe Abb. 3.10). Das Ziel war hierbei, eine höhere Flexibilität der Templatarme zu generieren, was einen positiven Einfluss auf den Ligationsumsatz haben soll. In diesem Zusammenhang sollte auch vor allem die Bildung des intramolekularen Nebenprodukts betrachtet werden. In dieser Reaktion findet vermutlich, nach der Ligation von ein

oder zwei Peptiden an das Templat, eine intramolekulare Ringschlussreaktion statt (vergleiche Abbildung 3.7). Wie beschrieben, liegen die Thiole der Cysteinreste nach erfolgreicher Ligation an das Templat frei vor und könnten intramolekular an einen Thioester angreifen, an dem noch keine Ligation stattgefunden hat. Die Reaktionsbedingungen wurden ähnlich der in Abschnitt 3.2.4 untersuchten Ligation gewählt, da unter diesen Bedingungen am wenigsten Nebenprodukte erhalten wurden. Wie zuvor beschrieben sollte der Ansatz ohne exogene Thiole und unter Verwendung von TCEP sowie Na-Ascorbat erfolgen (Vergleiche Tabelle 3.4). Die Reaktionskontrolle

Tabelle 3.4. Native chemische Ligation der TG^{1st} und TG^{2nd} mit $CPP[GPP]_4$, ohne Thioladditive.

Puffer [mM]	pH	Templat [Äq.]	CPP[GPP] ₄ [Äq.]	TCEP [mM]	Na-Asc [mM]	DMSO [%]	Gdn [M]	T [°C]
100	7.4	1	10	50	100	10	6	RT

erfolgte mittels UPLC-MS nach Reaktionsstart (0 min), 30 min, 1 h sowie 2 h. In Abbildung 3.11 sind die einzelnen Chromatogramme, welche die entsprechenden Reaktionsverläufe zeigen, zusammengefasst. Zudem wurden die gefundenen Produkte mittels ESI-MS charakterisiert.

Den Ergebnissen der Ligation unter Einsatz von TG^{1st} ist zu entnehmen, dass keine Ligation des Peptids innerhalb von 2 h stattgefunden hat. Nach 2 h liegen das TG^{1st} als auch das Peptid unverändert vor. Dies ist überraschend, da in der zuvor untersuchten Reaktion von TG^{1st} mit $Cys[GPP]_3$ unter ähnlichen Bedingungen (vgl. 3.2.4) das gewünschte dreiarmlige Produkt gefunden werden konnte. Demnach scheinen die milderen Bedingungen, wie eine niedrigere Temperatur und kürzere Reaktionszeiten, nicht für eine Produktbildung auszureichen. Zusätzlich wurde ein längeres Peptid mit der Sequenz $CPP[GPP]_4$ und nicht $C[GPP]_3$ eingesetzt, was zusätzlich zu einer erhöhten Reaktionskinetik beiträgt. Es ist anzumerken, dass während beiden Reaktionen von TG^{1st} und TG^{2nd} keine Nebenreaktionen durch Oxidation festgestellt werden konnten. Die Ligation unter Verwendung des Templats der zweiten Generation (TG^{2nd}) zeigte hingegen unmittelbar nach Reaktionsstart die Bildung des einarmigen Produkts (Ligation eines Peptids mit dem Templat, T+1P). Mit steigender Reaktionszeit konnten zudem das zweiarmlige (T+2P) und dreiarmlige Produkt (T+3P) identifiziert werden. Neben den erwarteten Produkten konnte aber auch, unter Verwendung des TG^{2nd} , eine cyclische intramolekulare Ne-

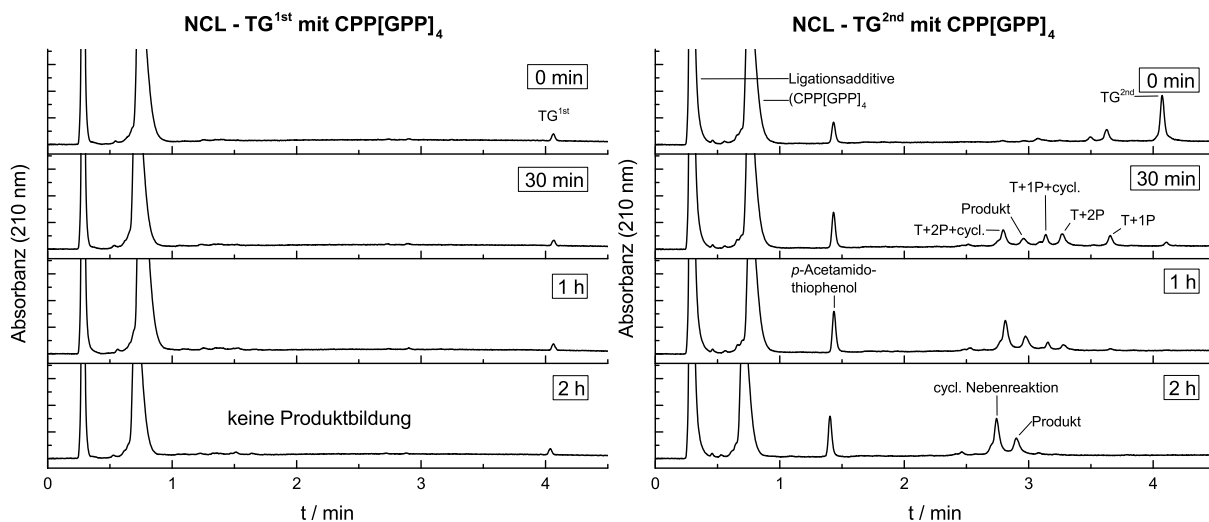


Abbildung 3.11. UPLC-MS Messungen der Ligationen von TG^{1st} (links) und TG^{2nd} (rechts), jeweils mit dem Peptid CPP[GPP]₄ nach Reaktionsstart, 30 min, 1 h und 2 h. Die Reaktionsbedingungen können der Tabelle 3.4 entnommen werden. UPLC: 210 nm, 60 °C; TG^{1st} (20 % B bis 70 % B, 4 min), TG^{2nd} (20 % B bis 40 % B, 4 min). Zur besseren Darstellung der Peaks mit geringerer Intensität wurden die Chromatogramme einheitlich vergrößert dargestellt (vollständige Ansicht der Chromatogramme siehe Abbildungen 5.21 und 5.22)

benreaktion beobachtet werden. Diese trat sowohl nach einfacher (T+1P+cycl.), als auch nach zweifacher Peptidligation (T+2P+cycl.) auf. Die Tatsache, dass m/z -Verhältnisse sowohl des einarmigen als auch des zweiarmigen intramolekularen Nebenproduktes im ESI-MS detektiert werden konnten, unterstützt die These, dass es sich hierbei um die postulierten Produkte handelt. Des Weiteren wird diese Annahme durch die entsprechenden Retentionszeiten der einzelnen Produkte unterstützt. Es konnte demnach eine verstärkte Retention der gebildeten Produkte in Reihe von (T+2P+cycl.) < (T+3P) < (T+1P+cycl.) < (T+2P) < (T+1P) beobachtet werden. Dies entspricht den Polaritäten der Produkte. Das einarmige Produkt (T+1P) weist zwei intakte Thioester auf, welche einen Phenylrest enthalten, ist somit am unpolarsten und wird am stärksten retendiert. Auf der anderen Seite enthält das T+2P+cycl. keine intakten Thioester des *p*-Acetamidothiophenols mehr und nur „zwei“ Peptidarme, ist demnach am polarsten und wird als erstes eluiert.

Es ist darauf hinzuweisen, dass bereits nach 1 h Reaktionszeit das TG^{2nd} vollständig umgesetzt wurde und nach 2 h lediglich das Produkt (T+3P) sowie das cyclische Nebenprodukt (T+2P+cycl.) aufzufinden waren. Demnach ist die Reaktion nach dieser Zeit beendet. Es kann

festgehalten werden, dass unter den gewählten Bedingungen erfolgreich eine dreifache Ligation am TG^{2nd} abläuft. Bei Einsatz des TG^{1st} hingegen, konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden. Dies lässt sich vermutlich auf eine schlechtere Löslichkeit des TG^{1st} und vor allem auf bessere Verfügbarkeit bzw. Erreichbarkeit der Ligationsstellen an den Templatarmen im TG^{2nd} zurückführen.

Die Problematik der cyclischen, intramolekularen Nebenreaktion konnte auch durch die Erweiterung des Templatkerns und somit einer Vergrößerung des Abstands von Templatkern zur Ligationsstelle nicht vollständig behoben werden. Der vergrößerte Abstand von [Gly-Xaa-Yaa]₄ sollte eine Ligation von drei Peptiden erleichtern und somit die Bildung des Nebenprodukts zurückdrängen. Im Vergleich zu der Ligation von TG^{1st} mit C[GPP]₃ (siehe Abschnitt 3.2.4), bei der ein Nebenprodukt zu Produkt-Verhältnis von 3:1 (Peakflächenanteil) erreicht wurde, wurde durch Ligation von TG^{2nd} mit CPP[GPP]₄ das Verhältnis auf 2:1 verbessert. Dies könnte aber auch auf den erhöhten Überschuss des Peptids zurückgeführt werden.

Die Erweiterung des Templates stellt insgesamt eine eindeutige Verbesserung dar. Es konnte nach kurzer Reaktionszeit unter milden Bedingungen eine vollständige Umsetzung des Templats erreicht und das gewünschte Produkt gebildet werden. Es war möglich dieses mittels UPLC-MS eindeutig zu identifizieren und zudem kann eine Basislinientrennung von Produkt und den restlichen Ligationsreagenzien erreicht werden, was eine mögliche Aufreinigung über semi-präparative HPLC ermöglicht.

Zudem bestehen theoretisch weitere Optionen, um die Produktausbeute weiter zu erhöhen. Es ist weiterhin möglich den Peptidüberschuss zu erhöhen, wodurch das Reaktionsgleichgewicht vermehrt auf die Seite des Produktes geschoben wird. Zudem ist eine semi-präparative Abtrennung der nicht umgesetzten Peptide, aber auch des intramolekularen Nebenproduktes möglich, was ein Recycling dieser Stoffe ermöglicht. Die Ringbildung des intramolekularen Nebenproduktes ist reversibel und könnte demnach nach erfolgter Abtrennung mit z. B. MesNa umgesetzt werden. Der in der cyclischen Nebenreaktion gebildete Thioester könnte so unter der Bildung eines neuen reaktiven Thioesters „aufgebrochen“ werden und stünde so erneut für eine native chemische Ligation zur Verfügung. Ein weiterer Reaktionsschritt vor der Ringspaltung könnte eingeführt werden, um die Thiole der Cysteine zu deaktivieren. Dafür würde sich die Entschwefelung von

Cystein→Alanin anbieten.¹³⁶ Allerdings müsste dieser Reaktionsschritt nach der finalen Ligation nochmals durchgeführt werden, um drei identische Peptidarme zu erhalten. Dies stellt weitere Möglichkeiten dar um die Synthese weiter zu optimieren. Da unter diesen Ligationsbedingungen allerdings eine ca. 33%ige Produktbildung (mittels Peakflächenanteil ermittelt) erreicht werden konnte, sollten diese Bedingungen für weitere Synthesen angewendet werden. Ähnliche Systeme, die in der Literatur beschrieben wurden (TREN-[suc-(Gly-Xaa-Yaa)₆]₃), und deren Herstellung vollständig am Harz erfolgte, erreichten eine Gesamtausbeute von 10-15%.⁸⁷ Somit stellt die hier vorgestellte Synthese zwar eine synthetisch aufwendigere Alternative dar, dennoch liegen die erzielten Vorteile in der möglichen Ligation verschiedener Peptidstränge als auch der einfachen Erreichbarkeit von längeren Peptiden. So wurden in dem hier vorgestellten Beispiel, Wiederholungen von [Gly-Xaa-Yaa]_n mit n = 9 erreicht. Zudem ermöglicht die Vergrößerung des Templots den leichten Einbau von sogenannten Schaltsegmenten. Die Einbringung dieser Segmente in die Peptide und deren Auswirkung auf die Kollagen-Dreifachhelix zusammen mit dem hier vorgestellten Templat, soll im folgenden Kapitel erfolgen.

3.3 pH-schaltbare Template

In den vorherigen Kapiteln wurde die Synthese von Templaten zum Einsatz in der nativen chemischen Ligation diskutiert. Zudem wurden die entsprechenden Ligationsbedingungen angepasst und verbessert. Das Templat der zweiten Generation (TG^{2nd}) soll im folgenden genauer untersucht werden. Einerseits wird dabei der Effekt des Templates betrachtet eine Proteinfaltung in die kollagenartige Dreifachhelix (CTH, engl. *collagen triple helix*) zu unterstützen. Auf der anderen Seite soll zusätzlich ein *O*-Acylisopeptid (DEPSI-Peptid oder im folgenden auch als Schaltsegment bezeichnet) in die Peptidstruktur eingebracht werden, um zusätzlich die Bildung der CTH zu steuern. Dass sowohl die native chemische Ligation als auch die Verwendung von *O*-Acylisopeptiden geeignete Werkzeuge in der Peptidchemie darstellen, wurde unter anderem von Sohma *et al.*¹³⁷ aufgezeigt. Sie kombinierten beide Konzepte zur Synthese stark hydrophober Peptidsequenzen. Vor allem die Verwendung von *O*-Acylisopeptiden stellte sich bereits als geeignete Methode zur Unterdrückung der Peptidstruktur und deren gezielte Ausbildung nach Schaltung des Segments heraus.^{118,119}

3.3.1 Schaltung der CMPs und Einfluss auf die CTH Bildung

In diesem Abschnitt sollen die Methodiken der nativen chemischen Ligation und der DEPSI Peptide miteinander verbunden werden, um eine möglichst effektive Steuerung der Bildung der Kollagen-Dreifachhelix zu erreichen. Das Konzept, um dieses Ziel umzusetzen ist Abbildung 3.12 zusammengefasst. Wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, wird das Templat der zweiten Generation (TG^{2nd}) zunächst an der festen Phase synthetisiert. Allerdings werden nun in das Templat *O*-Acylisopeptide eingesetzt, die im späteren Verlauf der Synthese gezielt geschaltet werden sollen. Das Prinzip dieser DEPSI-Peptide wurde in Abschnitt 2.3.1 beschrieben.

Dazu wurde die Peptidsequenz GPPGPPG(ψ)SPGPP (**18**) an fester Phase synthetisiert. Das DEPSI Segment „Gly7(ψ)Ser8“ wurde durch die Kupplung eines Boc-geschützten Serins, welches eine ungeschützte Hydroxyfunktionalität trägt, gefolgt von der anschließenden Kupplung von Fmoc-Gly an diese β -OH-Funktionalität, aufgebaut. Die Herstellung ist in Abschnitt 5.3.6 beschrieben. Wie auch bei der Synthese ohne schaltbaren Strukturdefekt wurde TREN-(suc-

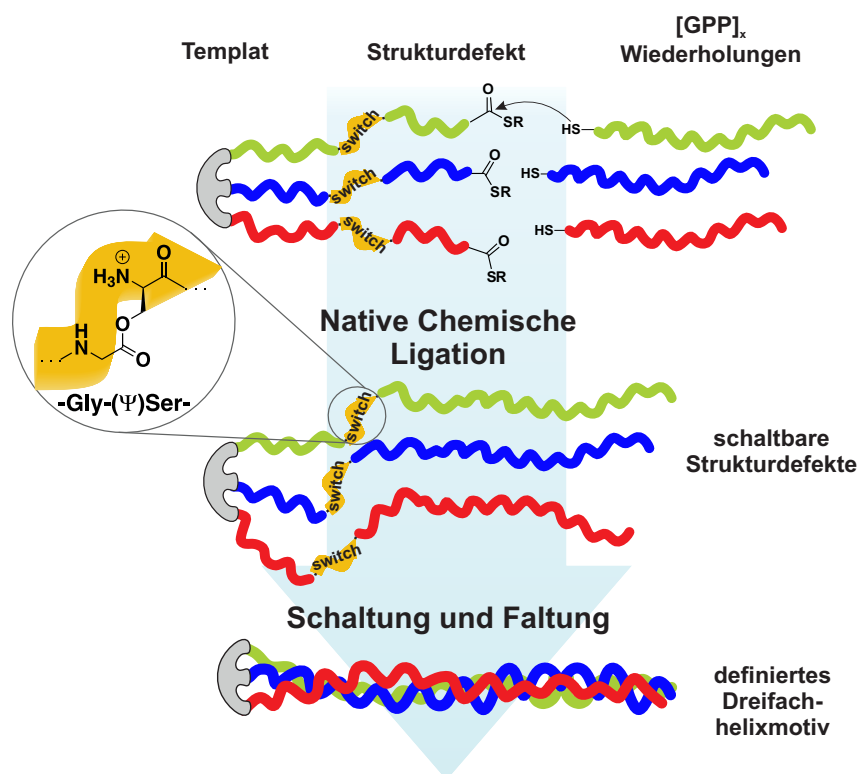


Abbildung 3.12. Schematische Darstellung von der Umsetzung eines schaltbaren Templates zur Kontrolle der Selbstorganisation von kollagen-mimetischen Peptiden (CMPs). Der erste Schritt (oben) ist die Fusion des Templates, welches ein strukturstörendes Schaltsegment trägt, mit kollagen-mimetischen Peptiden mittels nativer chemischer Ligation. Dies führt zu templatgebundenen Homotrimeren mit drei Schaltdefekten und reduzierter Aggregationstendenz (Mitte). Die abschließende Aktivierung der Selbstorganisation durch pH Änderung resultiert in der kontrollierten Bildung von Kollagen-Dreifachhelices (unten).

OH)₃ N-terminal an die Peptide gebunden, die sich an der festen Phase befinden (siehe Abbildung 3.13). Nach der Abspaltung vom Harz und anschließender Aufreinigung wurde **(19)** isoliert, welches das den TREN-(suc-OH)₃ Zentrum und drei gleiche CMP Stränge trägt, in denen jeweils ein schaltbarer Strukturdefekt untergebracht ist. Die C-terminalen Carboxygruppen konnten, unter der Verwendung von *p*-Acetamidothiophenol quantitativ in eine Thioesterfunktionalität überführt werden. Die resultierende Verbindung **(20)** wurde anschließend mit dem Peptid CPP[GPP]₄ unter NCL Bedingungen umgesetzt.

Die optimierten Bedingungen der nativen chemischen Ligation ohne exogene Thiole und unter Verwendung von Na-Ascorbat lieferten auch hier die besten Resultate. Das erhaltene Produkt TREN-(suc-GPPGPPG(ψ)SPGPP-CPP[GPP]₄)₃ (**22b**) weist in jedem Arm 9 „GPP“ Wiederholungen auf. Das Schaltsegment befindet sich an Position 8 und die G→C Substitution liegt

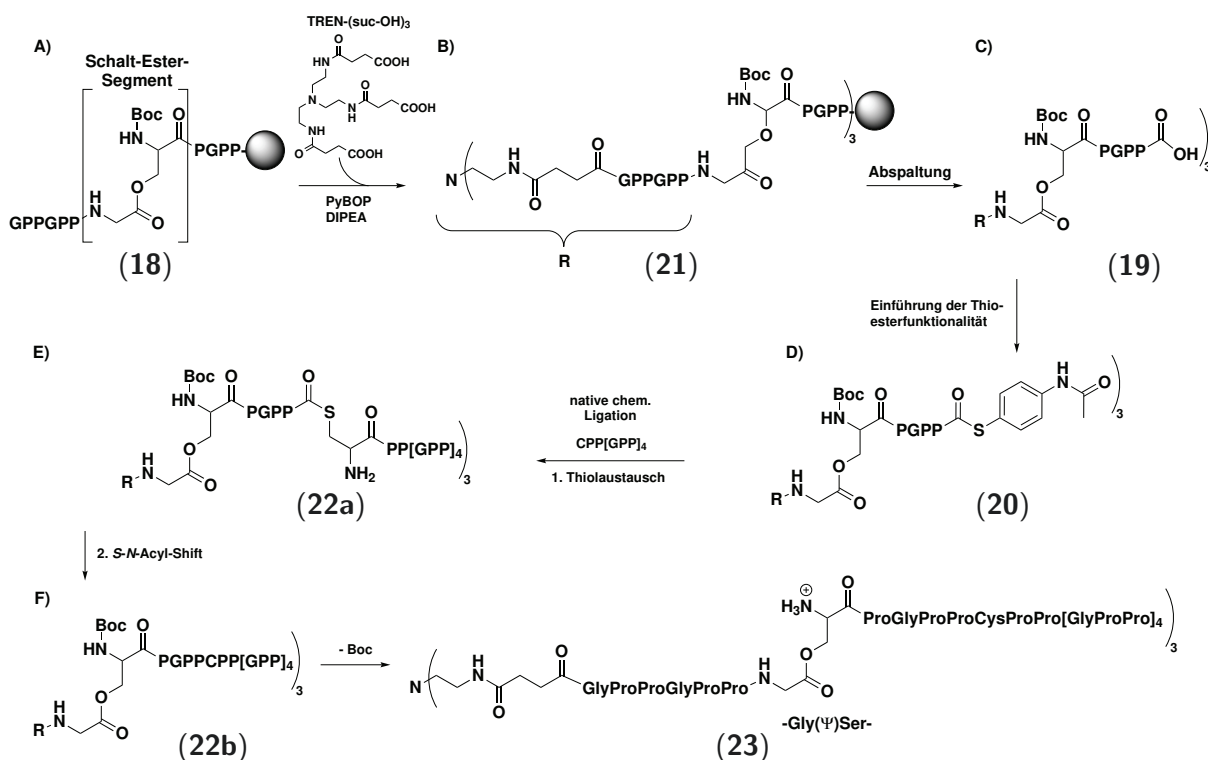


Abbildung 3.13. Synthese templatvororganisierter CMPs mit jeweils einem Peptidschaltsegment pro Peptidstrang. A) Harzgebundene Peptidsynthese einschließlich Synthese des Schaltsegmentes; B) Anbindung des Templatgerüsts bestehend aus dem TREN Kern, welcher drei Carboxyfunktionalitäten trägt; C) Freisetzung der an das Gerüst gebundenen Peptide unter leicht sauren Bedingungen, unter Erhalt der Boc-Schützungen des DEPSI, ermöglicht durch das säure-labile 2-Chlortriethylharz; D) Einbau der Thioesterfunktionalität durch Verwendung von *p*-Acetamidothiophenol; E) Native chemische Ligation des gefertigten Gerüsts und dem Cysteinylpeptid CPP[GPP]₄; F) Finales Ligationsprodukt, DEPSI-gestörte Struktur; Freisetzung des Schaltsegments resultiert in tripel-helikall-strukturierten Peptiden mit der Zusammensetzung TREN-(suc-GPPGPPGSPGPP-CPP[GPP]₄)₃.

auf Position 13. (22b) wurde chromatographisch gereinigt und mittel UPLC-MS identifiziert. In einem finalen Schritt wurde das CMP vollständig entschützt und unter leicht sauren Bedingungen gelagert (pH 5). Diese Vorgehensweise stellt die Protonierung des Schaltsegments und somit des Strukturdefekts sicher (siehe Abb. 3.12 sowie (23), CMP^(+T+S)). Als Vergleich diente die Negativkontrolle ohne Schaltsegment TREN-(suc-GPPGPPGSPGPP-CPP[GPP]₄)₃ (24) (CMP^(+T-S)). Zudem komplettieren die Kontrollen ohne Templat mit Schaltsegment H-GPPGPPG(ψ)SPGPP-[CPP]₄ (25) (CMP^(-T+S)) und ohne Schaltsegment H-GPPGPPGSPGPP-CPP[GPP]₄ (26) (CMP^(-T-S)) das Probenet.

Alle Schaltsysteme ((23) & (25)) sind in Phosphatpuffer gut löslich und weisen strukturelle

Stabilität bei pH 5.0 auf. Ein leichter Anstieg des pH Wertes auf 6.2 oder höher löst den kontrollierten *O-N*-Acyltransfer aus, welcher bei höherem pH schneller abläuft.^{116–119} So wurde zum Beispiel ein $t_{1/2}$ -Wert von 1 min für die intramolekulare *O-N*-Acylmigration für A β 1-42 Peptide bei einem pH Wert von 7.4 festgestellt.¹¹⁷ Daraus ergibt sich die Frage, in wie weit sich das Templat und das Schaltsegment auf die Ausbildung der Kollagendreifachhelix auswirken. Die Fähigkeit der Peptide eine stabile Dreifachhelix zu bilden, wurde mittels Circular dichroismus (CD) Spektroskopie genauer untersucht. Circular dichroismus ist eine etablierte Methode zur Beurteilung der Sekundärstruktur und Faltung von Proteinen. CD wird als die ungleiche Absorption von links- und rechtshändigem zirkular polarisiertem Licht definiert. Er wird entweder in Einheiten von ΔE angegeben, der Differenz der Absorption von E_R (rechts) und E_L (links) durch ein asymmetrisches Molekül oder in Grad Elliptizität (θ).^{138,139} Im folgenden wird die Elliptizität θ als mittlere Restelliptizität $[\theta]$ (MRE, *mean residue ellipticity*) angegeben (zur Umrechnung siehe 5.2.2). Daraus ergibt sich, dass mittels CD eine Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen erfolgen kann. Wenn die Chromophore der Amide des Polypeptidrückgrats von Proteinen in Arrays ausgerichtet sind, werden ihre optischen Übergänge als Folge von Exziton-Wechselwirkungen verschoben oder in mehrere Übergänge aufgespalten. Das Ergebnis ist, dass verschiedene Strukturelemente charakteristische CD-Spektren aufweisen.¹⁴⁰ Für kollagenartige Peptide bedeutet dies, dass ein Unterschied zwischen dreifach helikalem und unstrukturiertem Kollagen nachgewiesen werden kann. Im Allgemeinen wird ein CD-Spektrum tripel-helikalen Kollagens einen positiven Cotton-Effekt bei 220-230 nm und einen negativen Cotton-Effekt zwischen 190-210 nm aufweisen. Wenn Kollagen nicht strukturiert ist, verschwindet der positive Cotton-Effekt, während der negative Cotton-Effekt weitgehend unverändert bleibt.¹³⁹ Beide Werte hängen stark von den Reaktionsbedingungen ab, wie z. B. Pufferkomponenten, Konzentrationen und Temperatur. Zudem können durch gefaltete Domänen innerhalb des Proteins Überlagerungssignale erhalten werden die der typischen kanonischen α -Helix-, β -Faltblatt- und *Random-Coil* Strukturen entsprechen.¹³⁹ Die templatgebundenen Peptide mit und ohne Schaltsegment ((**23**), CMP^(+T+S) & (**24**), CMP^(+T-S)), sowie die nicht-templatgebundenen Peptidstränge ((**25**), CMP^(-T+S) & (**27**), CMP^(-T-S)), wurden bei pH 7.4 und einer Konzentration von 10 mg/mL (4 °C) für zwei Tage inkubiert, Aliquote von diesen Lösungen wurden auf 0.2 mg/mL verdünnt und nach 2 bzw. 7 Tagen mittels CD-Spektroskopie vermessen. Es ist zu erwähnen, dass alle Peptide, welche

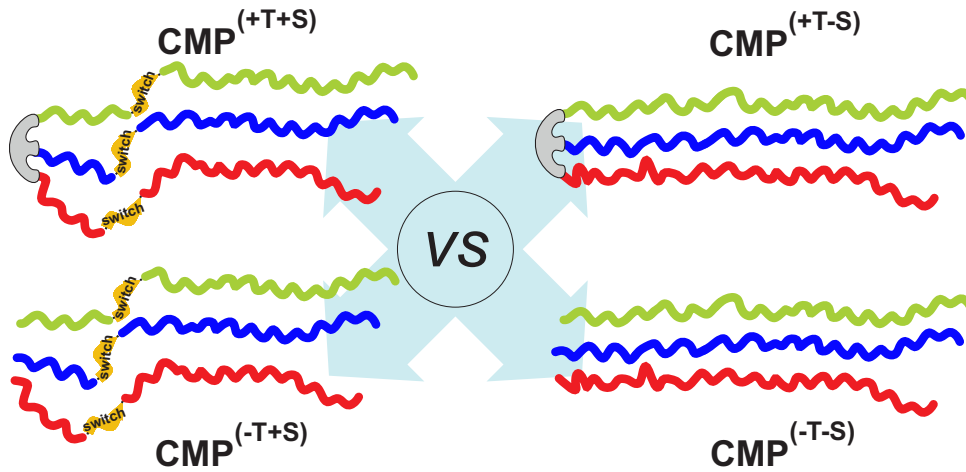


Abbildung 3.14. Schematische Darstellung der CMPs mit und ohne Templat, sowie mit und ohne struktureller Störstelle.

ein Templat tragen, einen positiven Cotton-Effekt bei ~ 227 nm aufwiesen, was ausschlaggebend für die Anwesenheit einer Kollagen-Tripelhelix ist. Dies hebt den definierten Effekt des Templates hervor eine CTH-Bildung zu begünstigen. Die Einführung einer schaltbaren Domäne führt zudem zusätzlich zu einer verstärkten Bildung der CTH. So zeigte das System, welches ein Schaltsegment enthält, aber nicht an ein Templat gebunden wurde, einen positiven Effekt bezüglich der Veränderung der Struktur in eine Dreifachhelix, was durch den Anstieg der Elliptizität bei 227 nm zu erkennen war ($\text{CMP}^{(+T-S)} \rightarrow \text{CMP}^{(+T+S)}$ und $\text{CMP}^{(-T-S)} \rightarrow \text{CMP}^{(-T+S)}$).

Die quantitative Evaluierung der Entwicklung einer Dreifachhelix mit fortschreitender Inkubationszeit bei pH 7.4 zeigte die unterschiedlichen Effekte des Templates sowie des Schaltsegmentes (siehe Abbildung 3.15). Die templatgebundenen CMPs ($\text{CMP}^{(+T+S)}$ & $\text{CMP}^{(+T-S)}$) wiesen die höchste Veränderung der Elliptizität über die Zeit auf. $\text{CMP}^{(+T+S)}$ mit Templat und Schaltsegment erreichte mit $[\theta_{\max(+T+S)}] = 1.0 \times 10^3 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ die höchste Elliptizität und einen Anstieg von 14 % zwischen 2 und 7 Tagen Inkubation. Im Vergleich dazu zeigte das $\text{CMP}^{(+T-S)}$ mit Templat aber ohne Schaltsegment nach 7 Tagen eine Elliptizität von $[\theta_{\max(+T-S)}] = 0.58 \times 10^3 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ aber einen Anstieg von 64 % von Tag zwei bis Tag sieben. Allem Anschein nach liefert das Schaltsegment einen Beitrag zu der Strukturdynamik indem sich die drei Peptidstränge schon in den ersten beiden Tagen mit höherer Perfektion in einer CTH anordnen. Bei pH 7.4 findet ein schneller $O \rightarrow N$ -Acyltransfer statt¹¹⁷, welcher die Ausbildung einer Kollagen-Dreifachhelix unterstützt. Es kann die Annahme getroffen werden, dass sich ohne die strukturstörenden Schaltsegmente die Peptide zunächst in einer Konformation

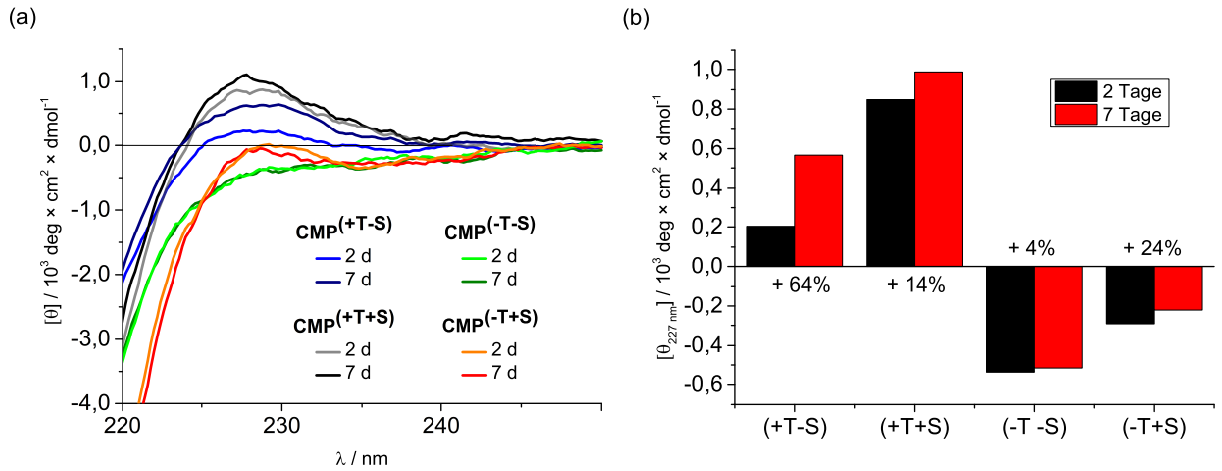


Abbildung 3.15. (a) CD-Messungen der CMPs inkubiert bei pH 7.4 nach zwei sowie 7 Tagen Equilibrierung und (b) Zusammenfassung der Änderungen der Elliptizitäten bei 227 nm als relevanter Indikator für CTH-Bildung (Bedingungen: 0.2 mg/mL Probenkonzentration in 100 mM Phosphatpuffer bei 4 °C)

mit einem lokalen Energie-Minimum anordnen und anschließend die energetischen Barrieren zu einem favorisierten Dreifachhelix-Motiv nur langsam überwunden werden können. Die maximale molare Elliptizität von $\text{CMP}(^{+T+S})$ bei $[\theta_{\max(+T+S)}] = 1.0 \times 10^3 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ist vergleichbar mit ähnlichen Konstrukten, wie z. B. die der TREN-[suc-(Gly-Nleu-Pro)₆-NH₂]₃ Systeme von Kwak *et al.*⁸⁷ ($0.8 \times 10^4 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$).^{42,87} Es ist allerdings zu beachten, dass ein Vergleich unterschiedlicher Systeme nicht immer eingängig ist, da viele Faktoren wie Temperatur oder Konzentration einen Einfluss auf die Messung haben. Die Erreichte maximale Elliptizität ist dennoch bemerkenswert, da es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Peptiden um vergleichsweise kurze Sequenzen mit lediglich 9 „GPP“ Wiederholungen handelt und kollagenfremde Aminosäuren wie Cystein und Serin eingebaut wurden. Diese Aminosäuren haben vermutlich einen negativen Einfluss auf die Bildung der Dreifachhelix, da sie die Ringkonformation, Wasserstoff-Brückenbindungen sowie die sterischen Wechselwirkungen zwischen den Peptidsträngen beeinflussen, welche wichtige Faktoren für die Stabilität der CTH sind.^{39,41,43,100,107,141–143} Für beide Referenzpeptide ohne Templat ($\text{CMP}^{(-T+S)}$ & $\text{CMP}^{(-T-S)}$), konnte keine Struktur einer Dreifachhelix nachgewiesen werden, da sie bei 227 nm eine negative mittlere Restelliptizität nach 2 und 7 Tagen Inkubationszeit aufwiesen. Innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen ergibt sich so eine konstante Elliptizität. Dies lässt darauf schließen, dass die lokalen Minima der Strukturen schnell erreicht wurden und die CTH-Formation nicht favorisiert wurde. Diese Ergebnisse heben

die Relevanz der organischen Template bezüglich der Vororganisation der CTH-Motive sowie für die Reduktion fehlgebildeter Aggregation hervor. Es ist zu beobachten, dass der Schalteffekt kaum einen Einfluss auf die Peptidorganisation hat, wenn die Peptidstränge nicht an ein Templat gebunden wurden. Obwohl $\text{CMP}^{(-T+S)}$ verglichen mit $\text{CMP}^{(-T-S)}$ eine leicht höhere Elliptizität aufweist, bleibt die Intensität insgesamt negativ. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Templat die Peptide in angemessener Weise verankert und so eine hohe lokale Konzentration der drei Peptidstränge bereitstellt. Dies führt letztendlich durch Vororganisation zu einer Reduzierung der Entropie (entropische Strafe) und daraus folgend wird die intramolekulare Faltung vereinfacht.⁸⁷ Die Schaltsegmente hingegen unterdrücken anscheinend die frühe Fehl ASSOZIIERUNGEN der Peptidstränge, wenn sie durch ein Templat in nähere Umgebung gebracht werden und unterstützen so die Bildung der Kollagen-Tripelhelix durch Erhöhung der initialen Struktur-dynamik.⁸⁷ Der Einfluss des Schaltprozesses auf die Peptidorganisation bei templatgebundenen CMPs ist evident, obwohl die Geschwindigkeit des Schaltevents bei pH 7.2 sehr schnell abläuft (Minuten) verglichen mit der gesamten Strukturoptimierung (Tage).

3.3.2 pH-abhängige CD-Messungen

Um weitere Erkenntnisse bezüglich der exakten Zeitabfolge des Prozesses der Helixbildung zu erhalten, wurden pH-Sprung-Experimente durchgeführt (Abbildung 3.16). Hierfür wurden templatgebundene Peptide mit und ohne Schaltsegment ($\text{CMP}^{(+T+S)}$ & $(+T-S)$) separat für einen Tag bei pH 5.0 equilibriert. Anschließend wurden die Proben von 10 mg/mL mit Puffer der finalen pH-Werte von pH 5.0 oder pH 7.4 auf 0.2 mg/mL verdünnt (Abbildung 3.16 (b), $t = 0$ h). Die genommenen Proben wurden mittels CD-Spektroskopie untersucht, um die Entwicklung der Elliptizität bei 227 nm abzubilden (siehe Abbildung 3.16). Tatsächlich zeigten beide $\text{CMP}^{(+T+S)}$ Proben bei pH 5.0 und pH 7.0 schon bei $t = 0$ h eine höhere Elliptizität verglichen mit den entsprechenden Kontrollen $\text{CMP}^{(+T-S)}$ bei den jeweiligen pH-Werten. Diese Beobachtung bestätigt, dass die CTH Faltung der CMPs generell von den Schaltsegmenten unterstützt wurde. Übereinstimmend mit den obigen Experimenten steigt die Elliptizität der Proben, welche einen Schalter enthalten ($\text{CMP}^{(+T+S)}$), sofort nach dem Übergang von pH 5.0 zu pH 7.4 und erreicht das Maximum nach 2 h bei ca. $[\theta_{227nm}] = 0.6 \times 10^3 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. $\text{CMP}^{(+T+S)}$ hingegen zeigte bei pH 5.0 innerhalb des experimentellen Fehlers keinen signifikanten Anstieg der Elliptizität über die 7 Tage. Die Elliptizität bleibt bei Werten um $[\theta_{227nm}] = 0.12 \times 10^3 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ konstant.

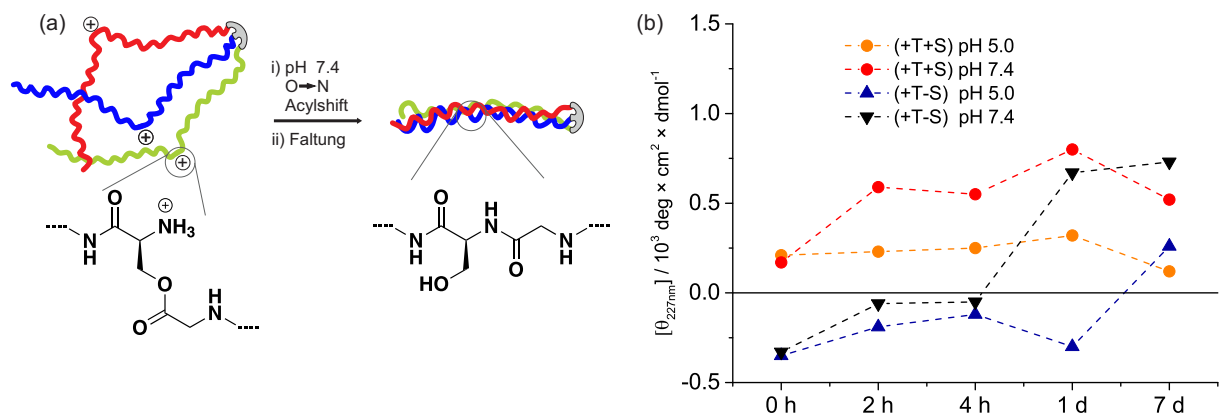


Abbildung 3.16. pH-Sprung-Experimente verdeutlichen den Einfluss des pH-gesteuerten Schalters für die Bildung der kollagenartigen Dreifachhelix. Schematische Illustration des Schaltevents als Auslöser der Bildung der Dreifachhelix (a) und Entwicklung der mittleren Restelliptizität durch CD-Spektroskopie bei pH 5.0 oder pH 7.4 gegenüber der Äquilibrierungszeit. Vergleich von schaltbaren mit nicht-schaltbaren CMPs (b) (Bedingungen: Inkubation der CMPs bei 10 mg/mL für einen Tag (4 °C) und Verdünnung auf 0.2 mg/mL Probenkonzentration in 100 mM Puffer bei pH 5.0 oder pH 7.4 ($t = 0$ h) bei 4 °C).

Während die mittlere Restelliptizität von $\text{CMP}^{(+T+S)}$ innerhalb von 2 h nach der pH-Erhöhung stark anstieg, zeigte $\text{CMP}^{(+T-S)}$ erst nach einem Tag eine signifikante Erhöhung der Elliptizität. Allerdings erreichten letztendlich $\text{CMP}^{(+T+S)}$ und $\text{CMP}^{(+T-S)}$ bei pH 7.4 ähnliche Elliptizitätswerte. Das deutet darauf hin, dass das Templat eine adäquate Vororganisation ermöglicht, was zu einer Bildung des CTH-Motivs führt. Das Schaltsegment stellt hingegen eine erhöhte Dynamik bereit, was in einem frühen Stadium eine noch schnellere Bildung der Dreifachhelix ermöglicht. In der Abwesenheit des Schaltdefekts wurde zwar letztendlich ein ähnliches Strukturmotiv eingenommen, allerdings mit einer geringeren Kinetik, was auf ein weniger dynamisches Anfangsstadium für die $\text{CMP}^{(+T-S)}$ schließen lässt. Diese Experimente deuten darauf hin, dass die CTH der templatgebundenen CMPs in einem thermodynamischen Gleichgewicht liegen, da die gleiche Struktur von zwei verschiedenen Ausgangszuständen erreicht werden kann, unabhängig ob von $\text{CMP}^{(+T+S)}$ oder $\text{CMP}^{(+T-S)}$ ausgegangen wurde.^{144,145}

Obwohl die Experimente zur pH-Erhöhung einen eindeutig positiven Effekt des Schaltsegmentes auf die Peptidfaltung aufzeigen konnten, könnte angenommen werden, dass die Equilibrierung bei pH 5.0 generell die ordentliche Faltung behindert. Dies könnte in CD Messungen resultieren, die niedrigere Elliptizitäten bei pH 5.0 aufweisen als die entsprechenden Experimente bei pH 7.4. Um auszuschließen, dass der Anstieg der Elliptizität nicht auf die Änderung des pH-Wertes zurückzuführen ist, wurde das Experiment mit der nicht-schaltbaren Kontrolle $\text{CMP}^{(+T-S)}$ unter gleichen Bedingungen wiederholt (siehe Abb. 3.16). Es zeigte sich auch bei pH 5.0, dass beide Proben ($\text{CMP}^{(+T+S)}$ & $\text{CMP}^{(+T-S)}$) im Endeffekt ähnliche Intensitäten der Elliptizität von ca. $[\theta_{227nm}] = 0.2 \times 10^3 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ erreichten.

3.3.3 Temperaturabhängige CD-Messungen

Circulardichroismus ist eine ausgezeichnete spektroskopische Technik um das Falten und Entfalten von Proteinen als Funktion der Temperatur zu verfolgen. Die Kollagen-Dreifachhelix zeigt ein charakteristisches CD/Spektrum basierend auf dessen hochgradig geordneter Struktur. Wenn diese Proteine entfalten verlieren sie diese Struktur, was in einer Änderung der CD-Banden resultiert. Kollagene können sich vollständig entfalten und ihr entfaltetes Spektrum ähnelt dem einer Mischung kurzer Polypeptide.¹⁴⁶ Die Änderung des CD-Signals als Funktion der Temperatur bei

charakteristischen Wellenlängen kann verwendet werden, um die Thermodynamik der Entfaltung (oder genauer die Zustandsänderung) zu bestimmen. Der Mittelpunkt des Entfaltungsübergangs (T_m , Schmelzpunkt) liefert somit eine Aussage über die Stabilität der Dreifachhelices.¹⁴⁷

Temperaturabhängige CD-Messungen wurden im Folgenden durchgeführt um das Schmelzen der Dreifachhelix-Motive bei 227 nm (siehe Abb. 3.17) zu untersuchen. Dabei wurde die Proben-temperatur, beginnend bei 4 °C, schrittweise erhöht und die Elliptizität bei 227 nm gemessen. Im Rahmen der Messungengenauigkeit der Methode zeigten die Strukturübergänge der $\text{CMP}^{(+T+S)}$ und $\text{CMP}^{(+T-S)}$ vergleichbare Werte der Schmelztemperatur (T_m) von 27.3 °C für $\text{CMP}^{(+T+S)}$ und 27.9 °C für $\text{CMP}^{(+T-S)}$. Die Übergangstemperaturen lagen im Bereich, der in der Literatur veröffentlichten Schmelztemperaturen von nicht-vororganisierten $[\text{GPP}]_{10}$ ($T_m = 23$ °C) und vororganisierten $\text{TREN-}[\text{suc-(Gly-Nleu-Pro)}_6\text{-NH}_2]_3$ ($T_m = 46$ °C) CMP-Konstrukten.^{3,87} Dies zeigt wiederum die verbesserte Bildung des CTH-Motivs, verglichen mit nicht templatgebundenen CMP-Strängen von $[\text{GPP}]_{10}$ und unterstützt den zuvor diskutierten Strukturstöreffekt von Cystein und Serin in den $[\text{GPP}]_x$ Strängen.^{3,12,87,148} Es ist erwähnenswert, dass bei $\text{CMP}^{(+T+S)}$, verglichen mit $\text{CMP}^{(+T-S)}$, ein unterschiedliches Maß des kooperativen Entfaltungsprozesses beobachtet werden konnte. Die $\text{CMP}^{(+T+S)}$ Schmelzübergänge weisen eine steilere Steigung auf als die $\text{CMP}^{(+T-S)}$. Dieser leicht höhere kooperative Effekt der Entfaltung für $\text{CMP}^{(+T+S)}$ bestärkt die Hypothese, dass der Schalteffekt einen hohen Anteil zu verbesserten Ausbildung des CTH-Strukturmotivs beiträgt. Es wichtig anzumerken, dass auf Grund der Streuung der Datenpunkte zur besseren Darstellung ein Fit der Daten gezeigt wird.

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass an das Templatgerüst $\text{TREN-(suc-GPPGPPGSPGPP-Thioester)}_3$ mittels nativer chemischer Ligation drei $\text{CPP}[\text{GPP}]_x$ Stränge unter der Bildung von monodispersen kollagen-mimetischen Peptiden angeknüpft werden können. Zudem konnten pH-kontrollierte DEPSI Segmente (Schaltdefekte) in das Peptidgerüst eingebracht werden, was eine pH geschaltete Bildung der Kollagendreifachhelix (CTH) erlaubt. Sowohl das organische Templat als auch die Schaltdefekte übten signifikanten Einfluss auf Bildung des CTH-Motivs aus. Dies wurde durch Langzeit-Equilibrierung, als auch pH-Sprungexperimente nachgewiesen.

Die Equilibrierung bei pH 5 verhindert die Faltung der Peptide in eine Kollagen-Dreifachhelix. Nach Umstellung auf pH 7.4 ordnen sich die Peptide, welche einen Schaltsegment einhalten

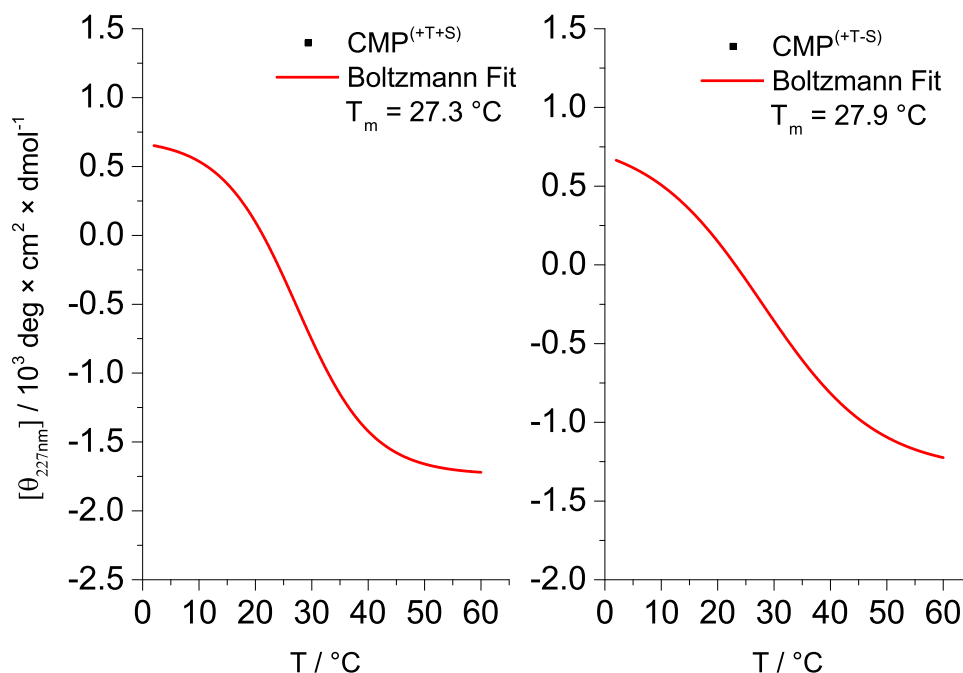


Abbildung 3.17. Schmelzstudien der Peptidstrukturen mittels CD Spektroskopie, gebildet durch pH-Anstieg induziertes Falten der $\text{CMP}^{(+T+S)}$ (links) und $\text{CMP}^{(+T-S)}$ (rechts) nach Equilibrierung über 5 Tage (Bedingungen: Inkubation der CMPs bei 10 mg/mL für 2 Tage (4 °C, 100 mM Puffer, pH 7.4), Verdünnung zu 0.2 mg/mL Probenkonzentration und Equilibrierung für 5 Tage vor der Messung, Aufheizgeschwindigkeit 1 °C/min)

wesentlich schneller in einem CTH-Motiv an. Gerüstgebundene Konstrukte mit und ohne Schalter, sowie entsprechende Kontrollen von nicht-templierten Peptidsträngen, wurden durch CD-Spektroskopie-Analyse verglichen. Strukturschmelzexperimente stützen die allgemeine Annahme, dass der Schalter offensichtlich zur Anpassung eines perfekteren CTH-Motivs beiträgt. Die Strategie könnte den Weg zu CMP-Konstrukten mit höherem Molekulargewicht ebnen, da möglicherweise rekombinant exprimierte $\text{CPP}[\text{GPP}]_x$ -Stränge oder andere rekombinante Kollagene verwendet werden können. Diese wären in der Anzahl der Wiederholungseinheiten nicht so begrenzt wie die in dieser Arbeit vorgestellten, chemisch synthetisierten $\text{CPP}[\text{GPP}]_x$ -Stränge.

Durch die Kombination des Templat- und DEPSI-Konzepts konnte die Ausbildung einer Peptidstruktur beeinflusst werden. In dem hier vorgestellten Ansatz wurde das Schaltsegment zentral in die Peptide eingebracht. In der Literatur zeigten Studien, dass auch mehrere DEPSI-Segmente in einem Peptid unterbracht werden können um die Peptidaggregation während der Synthese zu unterdrücken und so die Synthese von schwierigen Sequenzen zu vereinfachen.¹⁴⁹ In wie weit mehrere Schaltsegmente oder deren Position einen Einfluss auf die Kollagendreifachhelix

hat, sollte im Folgenden untersucht werden. Der große Vorteil des Templat-Ansatzes, ist der Erhalt von stark monodispersen Systemen, allerdings geht dies mit einem gewissen synthetischen Aufwand einher. Um mit möglichst geringen synthetischem Aufwand DEPSI Segmente an verschiedenen Positionen in CMPs einzubringen und deren Einfluss zu untersuchen, wurde ein weiteres Prinzip der Präorganisation herangezogen, welches in dem folgenden Kapitel beschrieben wird.

3.4 Cystein-Oxidation als Präorganisationsprinzip

Eine Alternative zur Templatstrategie stellt die Vororganisation mittels Verknüpfung von Peptiden über Disulfidbrücken dar. Anhand dieses Systems soll der Einfluss von DEPSI Segmenten auf die Strukturbildung der kollagenartigen Peptide genauer untersucht werden. Das Einbringen von mehreren Schaltsegmenten und deren Positionierung entlang kollagenartiger Peptide bedarf zwar eines möglichst einfachen Systems, wie aber bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, spielt die Vororganisation der einzelnen Peptidstränge eine maßgebliche Rolle in der Bildung kollagenartiger Tripelhelices. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Einfluss der DEPSI Segmente auf die finale Peptidstruktur stark von der Vororganisation abhängig ist. Aus diesem Grund soll auf eine Vororganisation der Peptide nicht verzichtet werden. Wie schon erwähnt stellt die zuvor verwendete Templatstrategie besondere Anforderungen an die Synthese, wodurch diese für weitere Untersuchungen nicht die erste Wahl darstellte. Stattdessen sollte die Assemblierung der Peptide mittels Cys-Cys-Oxidation erreicht werden, bei der Disulfidbrückenverknüpfungen mehrerer Peptidstränge ausgenutzt werden sollten. Die „Cystein-Knoten-Strategie“ wurde vielfältig in der Literatur beschrieben und basiert auf, in der Natur auftretenden, cysteinreichen Domänen.⁶¹ Solch ein Cystein-Knoten erleichtert die Faltung von drei Peptidsträngen über primäre Assemblierung einer nicht kollagenen Peptiddomäne. Somit wird ein effizienter Kern für die Selbstorganisation von drei CMP-Strängen bereitgestellt und die Thermostabilität des resultierenden CTH erhöht.⁶³ Die Cystein-Knoten-Strategie kann zu einer signifikanten Stabilisierung der Tripelhelices von kollagen-mimetischen Peptiden (CMPs) führen, auch wenn die Peptidsequenz kein Hydroxyprolin aufweist.^{64,65} In dieser Arbeit wurde das

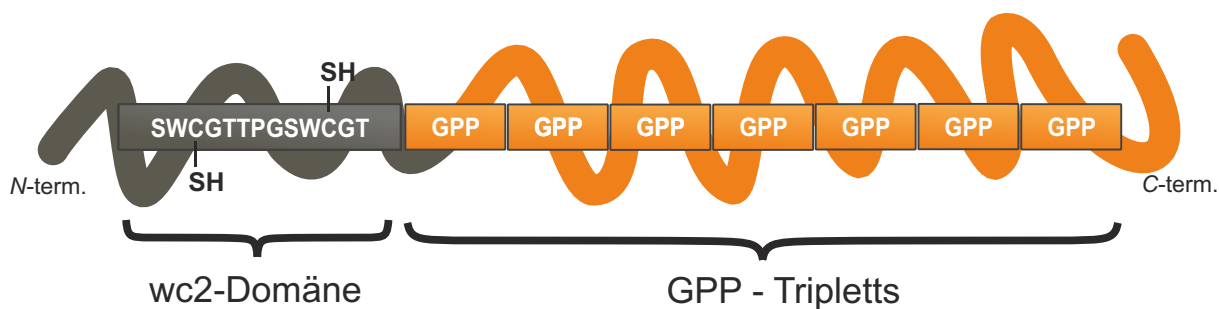


Abbildung 3.18. Aufbau der wc2-[GPP]_x Peptide.

Aminosäure-Foldon, bestehend aus dem 13mer SWCGTTPGSWCGT (wc2)ⁱ, verwendet. Diese Domäne enthält zwei Cysteinreste die unter oxidativen Bedingungen intermolekulare Disulfid-Brücken ausbilden (siehe Abbildung 3.18). An diese Sequenz werden *N*-terminal die bekannten [GPP]_{*x*}-Wiederholungen geknüpft. Im Folgenden soll der Einfluss von Schaltsegmenten entlang dieser Peptidstränge untersucht werden. Die Auswirkungen des wc2-Domäne wird im späteren Verlauf dieser Arbeit untersucht.

3.5 DEPSI-Lokalisation

In diesem Abschnitt wird das schaltbare kollagenartige Peptid wc2-[GPP]₇ als Modellsystem verwendet, in das Schalterdefektsegmente (DEPSI-Segmente) an verschiedenen Sequenzpositionen eingebaut wurden. Die Auswirkungen von Schalterdefekten soll bezüglich der Bildung der Kollagen-Tripelhelix und der Stabilität des Strukturmotivs untersucht werden. Um die wirkungsvollste Positionierung dieser Defekte in den wc2-[GPP]₇-Konstrukten aufzuklären wurden DEPSI-Segmente jeweils am *N*-Terminus, *C*-Terminus oder beiden Termini eingesetzt.

3.5.1 Herstellung des Probensatzes und Überprüfung der DEPSI Integrität

Um detaillierte Einblicke in die Funktion eines Kontrollmechanismus für die Strukturbildung der Kollagen-Dreifachhelix (CTH) durch einen externen Stimulus zu gewähren, wurde die Eignung von Schaltsegmenten untersucht. Zu diesem Zweck wurden Schalterdefekte in ein geeignetes wc2-[GPP]₇-Modellkonstrukt an verschiedenen Sequenzpositionen eingebaut (Abbildung 3.19). Drei Konstrukte wurden durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) synthetisiert, das den Schalter am *N*-Terminus (Pep^{ψ_N}), den *C*-Terminus (Pep^{ψ_C}) sowie an beiden Termini (Pep^{ψ_{C/N}}) enthielten. Die wc2-Domäne zeigte bereits eine geeignete Gly8-Ser9-Sequenz, die den direkten Einbau des *N*-terminalen Switch-Defekts ermöglichte und zu Pep^{ψ_N} ohne weitere Sequenzmodifikationen führte. Der Schalterdefekt am *C*-Terminus erforderte die Modifikation der terminalen GPP-Triade der Kollagensequenz. Pro32 wurde mit einem Ser-Rest ausgetauscht, um ein Konstrukt mit dem Schalter in Position Gly31(ψ)Ser32 (Pep^{ψ_C}) zu bilden. Die Platzierung des

ⁱDie Domäne wc2 wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Scheibel (Universität Bayreuth) entwickelt.

Schaltsegments so nahe wie möglich am *N*-Terminus hat vermutlich den höchsten Einfluss auf die wc2-induzierte Tripelhelix-Keimbildung und die Positionierung des Defekts am *C*-Terminus wird mutmaßlich mehr Einfluss auf den Ausbreitungsprozess der Tripelhelix haben. Das Set von Schalterkonstrukten wurde um $\text{Pep}^{\psi C/N}$ ergänzt, wobei sowohl an der Position Gly8(ψ)Ser9- als auch Gly31(ψ)Ser32-Schalterdefekte eingebaut wurden. Darüber hinaus komplettierten zwei Nicht-Schalter-Peptidkontrollen den Probensatz. Einer davon enthält den Pro \rightarrow Ser-Austausch, aber keine Switch-Konnektivität bei Gly31-Ser32 (Pep^{GSP}) und der andere zeigt die ungestörte vollständige Kollagensequenz mit Gly31-Pro32-Pro33 (Pep^{GPP}). Die Synthese der Peptide






Peptidsequenz	Modifikation	Kürzel
SWCGTTP <u>G(ψ)</u> SWCGT[GPP] ₆ GPP		$\text{Pep}^{\psi N}$
SWCGTTP <u>G(ψ)</u> SWCGT[GPP] ₆ <u>G(ψ)</u> SP		$\text{Pep}^{\psi C/N}$
SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₆ <u>G(ψ)</u> SP		$\text{Pep}^{\psi C}$
SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₆ GSP		Pep^{GSP}
SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₆ GPP		Pep^{GPP}

Abbildung 3.19. Übersicht der verwendeten wc2-[GPP]₇ Konstrukte und schematische Illustrierung der Schaltsegmente.

wurde mittels SPPS auf einem 2-Chlortrityl-Harz durchgeführt. Die Herstellung des DEPSI-Segments erfolgte, wie auch in dem Kapitel zur Organotemplat-Strategie beschrieben, durch die Kupplung von Boc-Ser(OH)-OH, welches eine ungeschützte β -Hydroxygruppe trägt und der Anbindung von Fmoc-Gly-OH an diese Gruppe. Die Verwendung der Cystein-Oxidation als Präorganisationsprinzip weist einige Besonderheiten auf, die im Folgenden beschrieben werden. Obwohl das 2-Chlortrityl-Harz die Abspaltung der Peptide unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen erlaubt, wurden die Peptide letztendlich vollständig entschützt abgespalten, da die geschützten Peptide nur schwer löslich waren, was die weitere Aufarbeitung stark erschwerte. Die Peptide wurden mit TFA freigesetzt und während der Aufarbeitung und der Aufreinigung bei pH 5 gehalten um das Schaltsegment im aktivierten Zustand zu erhalten. Alle CMPs wurden mit einer Reinheit von >90 % hergestellt und die molekulare Struktur mittels UPLC-ESI-MS charakterisiert. Die Integrität der Schaltsegmente und deren Fähigkeit die pH-

induzierte *O*-*N*-Acyl-Umlagerung durchzuführen, wurden durch UPLC-MS- und IR-Analysen nachgewiesen. Mittels UPLC-MS konnte zwischen den Peptiden, die Schaltdefekte enthalten und den entsprechenden Referenzen ohne Schaltsegment unterschieden werden. Alle Peptide wurden separat in ACN/Wasser (1:10 v/v) mit 0.1 % HCOOH gelöst und vor der Messung mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) reduziert. Diese Messungen zeigten für die Schalt-Konstrukte $\text{Pep}^{\psi C/N}$, $\text{Pep}^{\psi C}$ und $\text{Pep}^{\psi N}$, dass die Peptide bei einem pH-Wert <5.5 zu 100 % im ungeschalteten Zustand vorliegen. $\text{Pep}^{\psi C/N}$ trägt zwei positiv geladene Schaltsegmente und zeigt die niedrigste Retentionszeit. $\text{Pep}^{\psi N}$ und $\text{Pep}^{\psi C}$ eluieren schneller verglichen mit der entsprechenden Referenz, da sie jeweils ein positiv geladenes Schaltsegment enthalten. Nach der pH-Einstellung auf pH 7.5 erfolgte unmittelbar der Umschaltvorgang, wie aus einer deutlichen Verschiebung der Retentionszeit ersichtlich ist. In Abbildung 3.20 werden die Messungen am Beispiel von $\text{Pep}^{\psi C}$ gezeigt. Die Kontrollen Pep^{GSP} und Pep^{GPP} zeigten keine Veränderung der Retention und somit keine Veränderung der Struktur (Abbildung 5.26). Ein weiterer Nachweis für die pH-induzierte Umlagerung von schaltbaren Peptidmotiven wurde durch IR-Spektroskopie erzielt. Die DEPSI-Estercarbonylbande bei 1779 cm^{-1} wurde vor und nach der Inkubation bei pH 7.5 betrachtet.

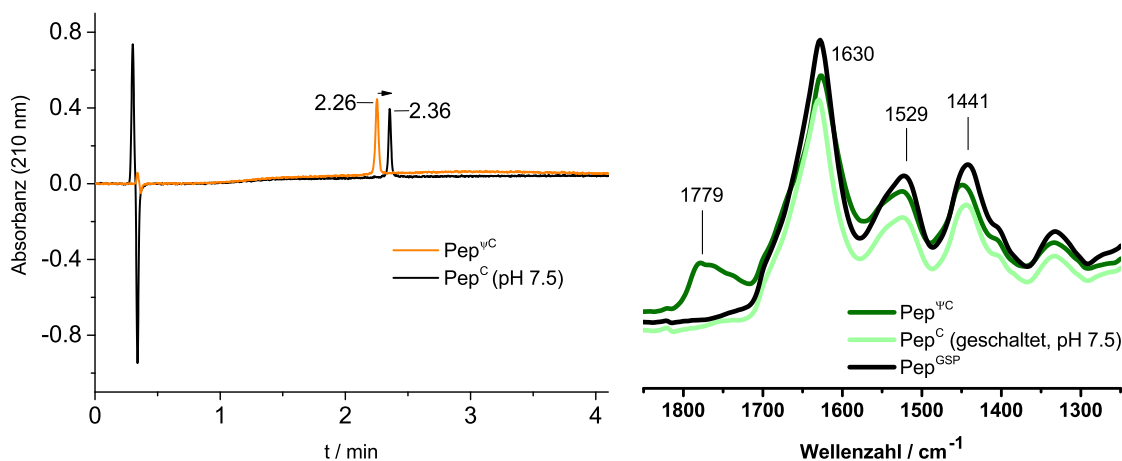


Abbildung 3.20. Kontrolle der Integrität und pH-Sensitivität des DEPSI Segments mittels UPLC-MS (links) sowie IR-Messungen (rechts) am Beispiel von $\text{Pep}^{\psi C}$ und der Referenz Pep^{GSP} . Die Peptide wurden nach Aufarbeitung vermessen. Für die UPLC-Messungen wurden die Peptide in ACN/Wasser (1:10 v/v) mit 0.1 % HCOOH gelöst. Der Schaltprozess wurde jeweils durch das Einstellen des pH-Werts mittels Na-Phosphatpuffer auf pH 7.5 ausgelöst. Die Proben wurden für die IR-Messungen zuvor gefriergetrocknet.

Der *O-N*-Acyltransfer wurde durch eine Inkubation der Peptide in Natrium-Phosphatpuffer (pH 7.5) ausgelöst. Vor Auslösung des Schaltsegmentes ist ein deutliches Signal des Estersegments bei 1779 cm^{-1} zu erkennen, welches nach Inkubation bei pH 7.5 verschwindet. In Abbildung 3.20 sind diese Ergebnisse anhand des Beispiels $\text{Pep}^{\psi C}$ aufgezeigt. Alle Schaltpeptide zeigten Carbonylbanden vor der Umlagerung und das Verschwinden der charakteristischen Banden nach pH-Wert-Änderung (siehe Abschnitt 5.10, Abbildung 5.27).

Diese Ergebnisse brachten den Nachweis für die Integrität der Schaltsegmente und deren pH-Sensitivität. Ein Vergleich des Einflusses dieser Segmente auf die Helixbildung setzte eine sorgfältige Präparation voraus. Es war zu beachten, dass während der Strukturbildung mehrere Prozesse Ablaufen, die im späteren Verlauf einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung der Kollagen-Dreifach-Helix (*collagen triple helix*, CTH) haben können. Dabei handelt es sich im Speziellen um die Ausbildung der Cys-Cys-Disulfidbindung, sowie um den *O-N*-Acylshift (Auflösung des Schaltsegmentes). Aus diesem Grund schien eine Separation dieser beiden Events zwingend erforderlich, um die Strukturbildung der Peptide punktgenau zu steuern. Da die Peptide vollständig entschützt vom Syntheseharz freigesetzt wurden, war eine ständige Kontrolle des pH-Wertes erforderlich, um das Schaltsegment im nicht-geschalteten Zustand ($-\text{Gly}(\psi)\text{Ser}-$) zu erhalten (vgl. Abb 3.21, links). Der pKs-Wert der α -Aminogruppe des Serins beträgt 9.05.¹⁵⁰

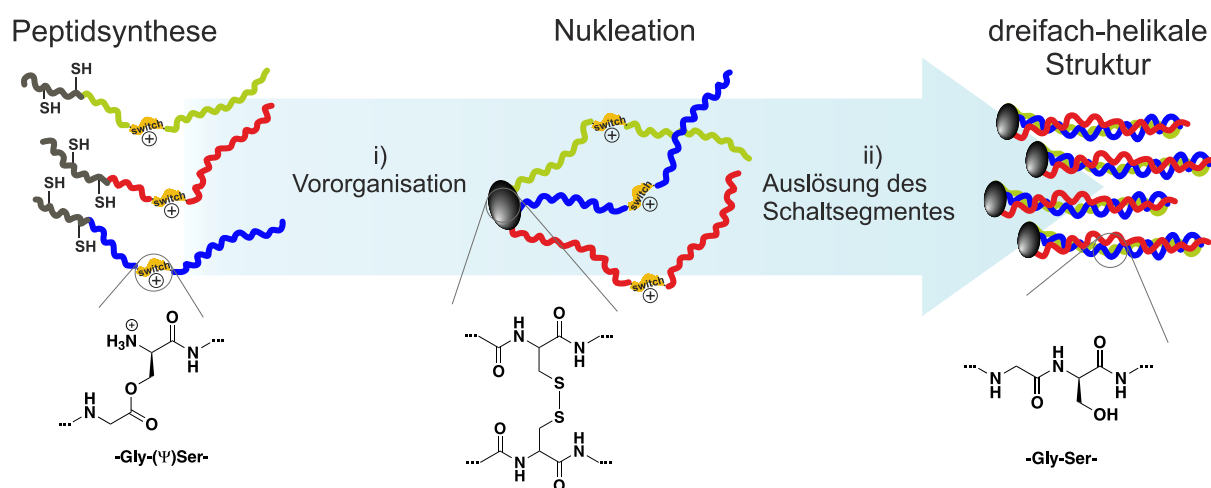


Abbildung 3.21. Schematische Illustration des Konzepts: Separierte Events von i) Vororganisation: Oxidation unter Erhalt des Schaltsegments bei pH 5 unter denaturierenden Bedingungen; ii) Auslösung des Schaltsegments: pH > 7 führt zu Ausbildung des *O*→*N*-Acyltransfers, was in einer nativen Peptidbindung resultiert, gefolgt von einer langsamen Equilibrierung der Peptide in dreifach-helikale Strukturen.

Nach der Hendersson-Hasselbach Gleichung lässt sich ermitteln, dass bei einem pH-Wert von 6.15 die Aminogruppe nahezu vollständig protoniert vorliegt. Somit erfolgte die Oxidation bei $\text{pH} \leq 5.5$ durch Zugabe von Wasserstoffperoxid unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Guanidinhydrochlorid (Gdn-HCl). Dies sollte die Flexibilität der Peptide sicherstellen. Diese Bedingungen wurden durch Titration mit verdünnter HCl erreicht, was ein intaktes Schaltsegment (-Gly(ψ)Ser-) sicherstellte. Allerdings musste gewährleistet werden, dass unter den gewählten Bedingungen eine Thiol-Thiol Oxidation erfolgen kann. Luo *et al.*¹⁵¹ zeigten, dass diese Reaktion bereits bei einem pH von pH 4 erfolgt, jedoch läuft die Disulfidoxidation mittels Wasserstoffperoxid bevorzugt unter basischen Bedingungen ab.¹⁵² Um den Ansprüchen eines intakten Schaltsegments sowie einem ausreichenden Oxidationsumsatz gerecht zu werden, wurde ein pH von 5 gewählt. Für diese Bedingungen zeigten exemplarische UPLC-MS Kontrollmessungen, unter Verwendung von Pep^{GSP} (siehe Abschnitt 5.9 und Abb. 3.22), dass die Oxidation zu einem Verbrauch des Ausgangsmaterials führte und eine breite Elution der Produktfraktion erfolgte. Für diese konnten mit ESI-MS Spezies von Multimeren nachgewiesen werden. So sind in Abbildung 3.22 die UPLC-MS Kontrollmessungen nach 6 min sowie 30 min abgebildet. Daraus ist zu entnehmen, dass unverzüglich nach Reaktionsstart die Bildung der Oxidationsprodukte stattfindet.

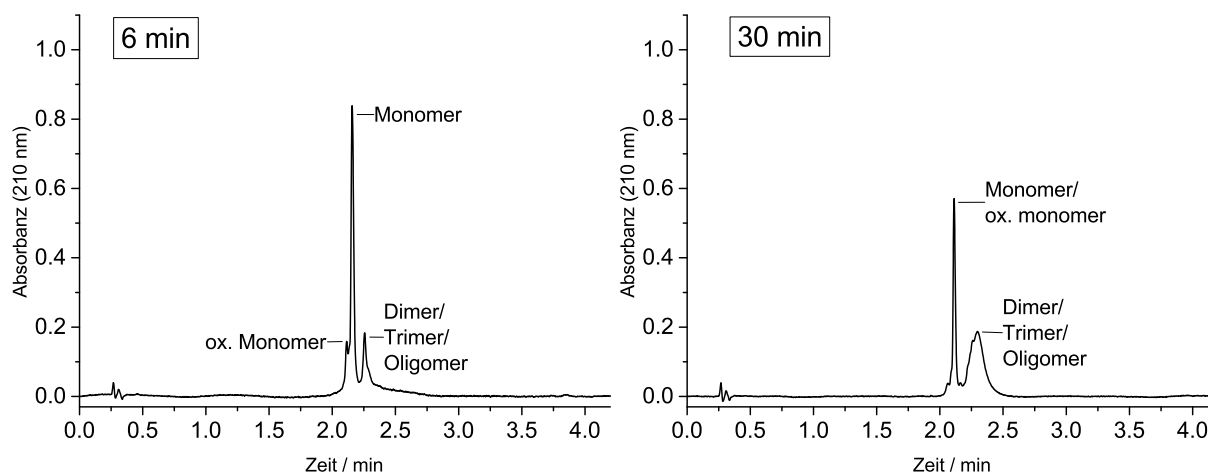


Abbildung 3.22. UPLC-Messungen oxidiertes Pep^{GSP} nach 6 min und 30 min. Es wurde jeweils eine kleine Menge des Rohproduktes injiziert. (UPLC-Konditionen: 210 nm, 10 % B bis 70 % B, 4 min, 60 °C)

Die durch Disulfidbrücken höher verzweigten Konstrukte zeigten, wie erwartet, eine erhöhte Retentionszeit im Vergleich zum Unimer. Außerdem stellt die intramolekulare Oxidation des Monomers ein unerwünschtes Nebenprodukt dar, welches sich aber auch durch Zusätze wie Glutathion nicht zurückdrängen ließ.^{59,63} Bei der intramolekularen Oxidation reagieren die beiden Cystein-Reste eines Peptidstranges unter Bildung einer Disulfidbrücke miteinander. Dennoch sind diese Ergebnisse bezüglich der Oxidationsprodukte zu erwarten. Zudem zeigten Untersuchungen von kollagenartigen Peptiden, in denen ebenfalls ein Cystein-Knoten eingesetzt wurde, dass die Herstellung bzw. Aufreinigung der Trimere problematisch ist und 100 % Trimer nur überaus schwer mit sehr geringer Ausbeute isoliert werden kann.^{63,65,153,154} Intramolekular oxidierte Monomere oder Dimere können auch ohne „perfekte“ Trimerisierung, nach ausreichender Equilibrierung, dreifach-helikale Strukturen ausbilden, indem eine Selbstorganisation stattfindet oder sie von bereits vorhandenen Strukturen rekrutiert werden. Die Cysteinhaltige wc2-Domäne ist als „Unterstützung“ zu verstehen, die die Bildung der Kollagen-Dreifachhelix beschleunigt. Weitere mögliche Nebenprodukte, wie die Bildung von Sulfin- (RSO_2H) oder Sulfonsäuren (RSO_3H) konnten nicht beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Reaktionsbedingungen optimal gewählt wurden.

Nach Beendigung der Oxidation wurde eine Dialyse gegen Zitronensäurepuffer (pH 6, 1 Tag, 10 mg/ml Peptidkonzentration) durchgeführt, um die denaturierenden Bedingungen (6 M Gdn·HCl) zu entfernen. Die Strukturausbildung der Peptide kann ab diesem Zeitpunkt erfolgen und wird durch das Aufheben des Strukturdefektes verstärkt. Dieser $O \rightarrow N$ -Acyltransfer wurde durch eine Erhöhung des pH Wertes auf pH 7.4 eingeleitet (Abbildung 3.21). Wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.3.1), erfolgt die intramolekulare $O \rightarrow N$ -Acylmigration schnell und somit kann eine schnelle Auflösung des Schaltsegments, gefolgt von einer verstärkten Tendenz der CMPs zur Selbstorganisation erfolgen.^{116–119}

3.5.2 CD-Spektroskopie

Um die mögliche Anordnung der Peptide in kollagenartige Dreifachhelices nachzuweisen, wurde erneut auf CD-Spektroskopie zurückgegriffen. Alle Schaltkonstrukte und ihre jeweiligen Kontrollen wurden 24 Stunden bei pH 7.4 inkubiert und vor den CD-Messungen auf 0.2 mg/mL verdünnt. Nach der Äquilibration zeigten alle Konstrukte CD-Spektren, die für Kollagen-Tripelhelixmotive charakteristisch sind. Ausschlaggebend ist der positive Cotton-Effekt mit einem Maximum bei 227 nm. Abbildung 3.23 fasst die mittleren Restelliptizitäten bei 227 nm zusammen.

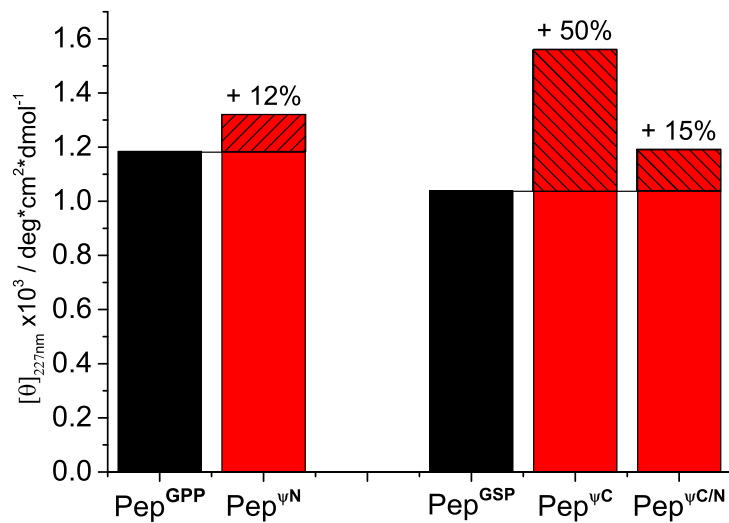


Abbildung 3.23. CD-Spektroskopie der oxidierten wc2-Peptide, Bedingungen: Oxidation erfolgte unter pH 5, 1 % H₂O₂, 6 M Gdn·HCl, Peptidkonzentration 50 mM, gefolgt von Dialyse und Equilibrierung (siehe Abschnitt 5.8.1 sowie 5.8.2), die Peptide wurden vor der ersten CD-Messung (2 Tage) auf 0.2 mg/mL verdünnt und unter diesen Bedingungen für 5 weitere Tage equilibriert (7 Tage). (a) Zusammenfassung der Änderung der Elliptizität bei 227 nm als relevanter Indikator für CTH Bildung, Prozentuale Änderung bezieht sich auf die Referenz Pep^{GSP} nach 2 Tagen bzw. 7 Tagen. (Spektren siehe Anhang 5.37)

Das Pep^{GPP}-Konstrukt, ohne implementierten Schaltdefekt, kann als Kontrolle betrachtet werden. Das Spektrum von Pep^{GPP} zeigte bei 227 nm einen um 14 % höheren Elliptizitätswert, verglichen mit dem der Pep^{GSP}-Referenz. Dies konnte erwartet werden, da Pep^{GSP} an Position 32 die kollagenfremde Aminosäure Serin enthält, welche in der Lage ist eine definierte Helixbildung zu stören.^{48,155,156} Interessanterweise zeigten alle Konstrukte, welche ein Schaltsegment enthalten (Pep^{ψN}, Pep^{ψC}, Pep^{ψC/N}) nach Äquilibration eine höhere Elliptizität bei 227 nm im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollkonstrukten (Pep^{GSP} oder Pep^{GPP}). Dies legt nahe, dass

auch in diesen Systemen die Implementierung von Schalterdomänen die Bildung von Kollagenmotiven unterstützt und sogar verbessert. Dies beruht wahrscheinlich auf einem Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Zum einen der Bereitstellung ausreichender Löslichkeit der Peptide und entsprechender Dynamik der Konstrukte, als auch der Verhinderung des frühzeitigen Einbindens von Peptidsträngen in schlecht definierten Aggregationsstufen. Genauer betrachtet zeigte der Vergleich beider Konstrukte ($\text{Pep}^{\psi N}$ und $\text{Pep}^{\psi C}$), die jeweils nur ein DEPSI-Segment am N - oder C -Terminus aufweisen, eindeutige Positionseffekte auf. $\text{Pep}^{\psi C}$ lieferte nach der Äquilibrierung die höchste Elliptizität aller Konstrukte bei 227 nm und zeigte eine 50 %ige Zunahme in Bezug auf die entsprechende Pep^{GSP} -Kontrolle. $\text{Pep}^{\psi N}$ erreichte Elliptizitätswerte bei 227 nm, die um 16 % niedriger waren als die von $\text{Pep}^{\psi C}$ und nur 12 % höher als die der jeweiligen Pep^{GPP} -Kontrolle. Diese Ergebnisse stimmen gut mit der Annahme überein, dass die Bildung der Kollagen-Tripelhelix einem reißverschlussartigen Mechanismus folgt, bei dem die Keimbildung beim wc2-Foldon beginnt, welcher an dem N -Terminus der Peptide lokalisiert ist.^{74,144} Wenn man dies berücksichtigt, kann man feststellen, dass $\text{Pep}^{\psi C}$ die CTH-Strukturen mit dem stärksten Cotton-Effekt bildet. $\text{Pep}^{\psi C}$ weist den Schalterdefekt am C -Terminus auf, eingebettet in die Kollagendomäne, um eine irreversible Aggregation zu verhindern. Dabei wird die Funktion des wc2-Foldons nicht beeinflusst. Dies steht im Gegensatz zu $\text{Pep}^{\psi N}$ bei dem der Schalterdefekt in dem wc2-Foldon angeordnet ist und daher die Organisation der Kollagendomäne im Vergleich zu $\text{Pep}^{\psi C}$ reduziert ist. Interessanterweise zeigte das $\text{Pep}^{\psi C/N}$, das an N - und C -terminaler Position Schaltdefekte aufwies, die niedrigsten Elliptizitätswerte aller Schalt-Peptide. Es wurde jedoch im Vergleich zur jeweiligen Pep^{GSP} -Kontrolle ein Anstieg der Elliptizitätsrate von 15 % beobachtet. Offensichtlich behindern die beiden Schaltsegmente zusammen die Organisation von $\text{Pep}^{\psi C/N}$ und so die Bildung von CTH-Arrangements, was in den Konstrukten $\text{Pep}^{\psi N}$ oder $\text{Pep}^{\psi C}$ nicht auftritt, da nur eine Schalterdefektstelle vorhanden ist. Eine Schlussfolgerung daraus könnte sein, dass die statistische Natur des Schaltvorgangs Schwierigkeiten für $\text{Pep}^{\psi C/N}$ verursacht. Trotz der Tatsache, dass der $O \rightarrow N$ -Acyltransfer im Vergleich zur Strukturäquibrierung schnell erfolgt, ist ein großer Satz an Multimerkonstrukten mit verschiedenen Schaltzuständen möglich. Diese verursachen bezüglich der Peptidstruktur inhomogene Defekte in der wc2-Domäne und in den Kollagenstrangabschnitten (0-3 Defekte N -terminal & 0-3 Defekte C -terminal). Das erwartete idealisierte Trimer könnte 32 Stufen von Schalterdefekten mit unterschiedlichen Aus-

wirkungen auf die wc2- und Kollagenssegmente bieten, was dazu führen könnte, dass sich CTHs mit verminderter Perfektion bilden.

3.5.3 Temperaturabhängige CD-Spektroskopie

Bei den Schalt-CMPs korrelieren die beobachteten Elliptizitäten gut mit der Stabilität des CTH-Motivs, was durch temperaturabhängige CD-Spektroskopie zur Überwachung des „Schmelzens“ der Dreifachhelix-Motive nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.24). Alle Peptide zeigten einen linearen Signalintensitätsverlust mit keiner oder sehr schwachen sigmoidalen Kurvenform, die auf eine kooperative „Entfaltung“ hindeuten würde (auf Grund der Streuung der Datenpunkte wird zur besseren Darstellung ein Fit der Daten gezeigt). Ein ähnliches Schmelzverhalten konnte für relativ kurze $[GPP]_x$ -Sequenzen beobachtet werden, denen die stabilisierende Wirkung von Hydroxyprolin fehlte.¹⁵⁷

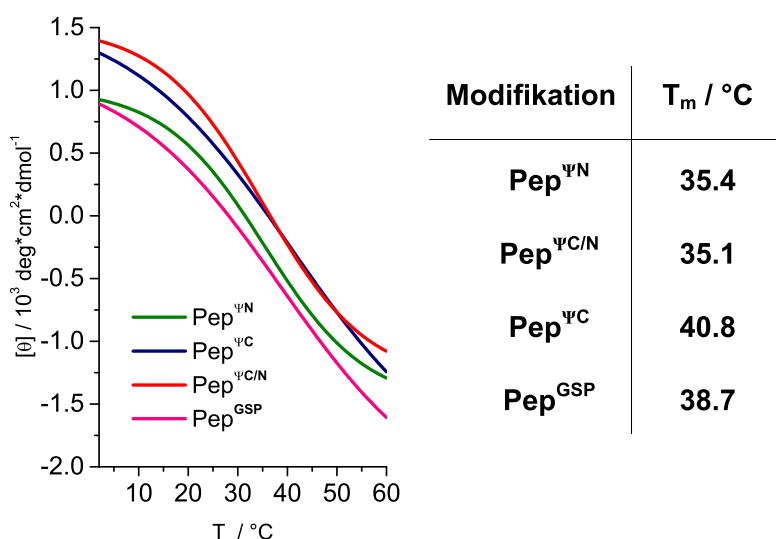


Abbildung 3.24. Schmelzkurven der wc2-Peptide, aufgenommen mittels CD-Spektroskopie. Ausbildung der Peptidstruktur erfolgte nach Oxidation und pH kontrollierter Faltung sowie Equilibrierung über 7 Tage (Bedingungen: 0.2 mg/mL Probenkonzentration in 100 mM Phosphatpuffer bei 4 °C, Heizrate 0.5 °C/min, abgebildete Kurven sind als Boltzmann Fit dargestellt, Schmelzpunkte (T_m) wurden über den Wendepunkt der Kurven ermittelt).

Darüber hinaus kann, wie bereits diskutiert, auch die kollagen-fremde Aminosäure Serin einen negativen Einfluss auf die Gesamtstabilität der Helix haben. Dies zeigt sich insbesondere bei ähnlichen Schmelzprofilen von Pep^{GSP} und Pep^{ψC}, die bei tiefen Temperaturen einen steilen Abfall des Kurvenverlaufs zeigen.

Durch den Vergleich von Pep^{GSP} -Referenz und $\text{Pep}^{\psi C}$ wurde die Annahme bestärkt, dass der Schalter am *C*-Terminus die Bildung des CTH in einer Art Reißverschluss-Mechanismus unterstützt, da der Austausch von Pro32→Ser32 bei einem Defekt des Schalters zu einem reduzierten Schmelzpunkt von ~ 39 °C führt. Die CMPs mit CTH-Strukturen weisen jedoch Schmelzpunktemperaturen (T_m) im Bereich von 35 bis 41 °C auf und zeigen strukturelle Schmelzpunkte die in ähnlichen Bereichen liegen wie die literaturbekannter $[\text{GPP}]_{10}$ -Konstrukte ($T_m = 28\text{-}36$ °C).^{42,158} Die Konstrukte $\text{Pep}^{\psi C/N}$ und $\text{Pep}^{\psi N}$, die beide ein *N*-terminales Schaltsegment aufweisen, zeigten CTHs mit T_m -Werten von etwa 35 °C. Diese konnten deutlich von denen des analogen $\text{Pep}^{\psi C}$ mit *C*-terminalem Schalter mit einer $T_m = 41$ °C unterschieden werden. Die Unterschiede in der thermischen Stabilität der CTH-Motive stimmen mit der Hypothese überein, dass *N*-terminale Schaltfehler die Foldon-Organisation im Prozess der oxidativen Knotenbildung stören und wahrscheinlich den Grad der Vororganisation der Kollagenstränge reduzieren.

3.5.4 pH-abhängige CD-Messungen

Um weitere Einblicke in den Umstellungsprozess zu erhalten, wurden pH-Sprung-Experimente durchgeführt. Dabei wurden das vielversprechendste Konstrukt $\text{Pep}^{\psi C}$ und die entsprechende Pep^{GSP} -Kontrolle nach der oxidativen Fixierung des wc2-Foldons zur weiteren Äquilibrierung auf pH 5 gehalten, bevor der pH-Wert durch Titration schnell auf pH 7.4 geändert wurde. Anschließend wurden CD-Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen, um die Entwicklung des für das CTH-Motiv charakteristische Signal bei 227 nm zu verfolgen (siehe Abbildung 3.25)). Wie bereits oben erwähnt, war bei pH 7.4 ein schnelles Schaltereignis mit Halbwertszeiten im Bereich von einer Minute zu erwarten. Wird die Zeit der Probenvorbereitung berücksichtigt, ist es schwer möglich die Kinetik direkt über CD-Spektroskopie zu beobachten.¹¹⁷ Es ist bemerkenswert, dass die Elliptizitätswerte von $\text{Pep}^{\psi C}$ direkt nach dem pH-Sprung bereits sehr hoch lagen und sie innerhalb der folgenden 4 Stunden der Äquilibrierung nur geringfügig ansteigen (Abbildung 3.25)). Dies legt nahe, dass $\text{Pep}^{\psi C}$ das CTH-Motiv sehr effizient bildet. In Anbetracht der Tatsache, dass der strukturstörende Einfluss in $\text{Pep}^{\psi C}$ vornehmlich am C-Terminus wirkt und am N-Terminus die wc2-Domäne zur Organisation der Tripelhelix beiträgt, kann angenommen werden, dass die Peptidstränge bereits vor dem Schaltschritt equilibriert und vororganisiert waren, so dass der Schaltvorgang schnell abläuft und die Peptide in dem korrekten CTH-Motiv arretiert wurden.

Dieser Befund ist umso interessanter, da der Pro32→Ser32-Defekt im geschalteten $\text{Pep}^{\psi C}$ vorhanden ist, der die CTH-Bildung stören sollte. Eine mögliche Erklärung dieses Effektes könnte in der Position des Schaltsegmentes liegen, welches sich am Ende des Peptidstranges befindet. Die Enden weisen auf Grund der höheren Flexibilität der Stränge eine stärkere Unordnung auf, was in höheren entropischen Kosten bei der Ordnung dieser Abschnitte resultiert. Diese Tatsache könnte den Einfluss des Schaltsegmentes relativieren. Die vorteilhafte Wirkung des Gly31(ψ)Ser32-Schalters in $\text{Pep}^{\psi C}$ ist jedoch offensichtlich bei Vergleich des CD-Cotton-Effektes mit dem der Pep^{GSP} -Kontrolle. Die Durchführung der Äquilibrierung und des pH-Sprunges mit Pep^{GSP} zeigte ein anderes Szenario und bestätigt den Einfluss des Schaltsegmentes. Die Elliptizität lag erheblich niedriger und nahm während der Gleichgewichtseinstellung weiter ab. Es konnte vermutet werden, dass die nicht gestörten Kollagensegmente, die keinen Gly31(ψ)-Ser32-

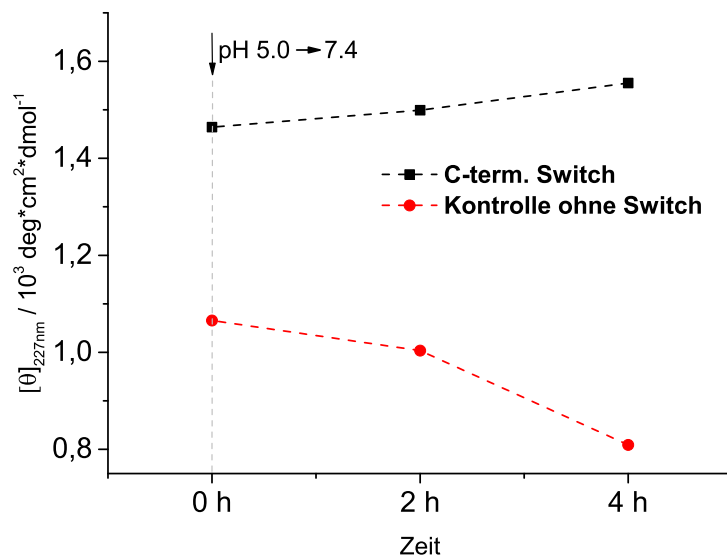


Abbildung 3.25. pH-abhängige CD Experimente: Vergleich von $\text{Pep}^{\psi C}$ und der entsprechenden Kontrolle Pep^{GSP} mittels CD Spektroskopie bei 227 nm (Die Konstrukte wurden zunächst unter denaturierenden Bedingungen bei pH 5 oxidiert. Nach Entfernung des Denaturierungsmittels erfolgte die Equilibrierung bei pH 5 für 24 h. Unmittelbar vor der Messung wurde der pH Wert auf 7.4 titriert; Bedingungen: Konstrukte (50 mM in 6 M Gdn·HCl, 1 % H_2O_2 , pH 5); 4 °C, Equilibrierung in 100 mM Zitronensäure/Natriumphosphatpuffer (pH 5, 10 mg/mL)).

Schalter aufweisen, die Organisation des wc2-Foldons selbst unter denaturierenden Bedingungen behindern. Infolgedessen scheinen sich weniger definierte Anordnungen zu bilden, die sich durch eine leichte Trübung in der Pep^{GSP} -Probenlösung und einer Verringerung der Elliptizitätswerte bei 227 nm bemerkbar machen (Abbildung 3.25).

3.6 Einfluss der wc2-Domäne auf die Bildung der Kollagen-Dreifachhelixⁱⁱ

Im Gegensatz zu den Untersuchungen in Kapitel 3.5, in denen der Fokus auf der Positionierung des DEPSI-Schaltsegmentes und dessen Auswirkungen auf die Kollagen-Dreifachhelix lag, soll in diesem Kapitel der Effekt der wc2-Domäne genauer untersucht werden. Dabei sollte der Einfluss einer Oxidation bzw. Reduktion der wc2-Domäne hinsichtlich der späteren Strukturbildung der CMPs genauer betrachtet werden. Zudem sollten die Kollagenstränge in der Länge variiert werden, um möglichst vergleichbare Eigenschaften in Bezug auf die Biokompatibilität zu natürlich vorkommenden Kollagen zu erreichen. Somit war ein Ziel dieses Projektes eine Methode für die technische Produktion kollagenähnlicher Peptide bzw. Proteine zu etablieren, die in *E.Coli* durchgeführt werden kann. Die Entwicklung dieses Prozesses wurde von Adrian Golser aus dem Arbeitskreis von Prof. Scheibel der Universität Bayreuth durchgeführt.¹⁵⁹ Eine weitere Eigenschaft der synthetisierten CMPs sollte zudem die biotechnologische oder chemische Modifizierbarkeit sein, bzw. sollten die Peptide zusätzliche spezifische Funktionalitäten bereit stellen, wie den möglichen Einbau von Zelladhäsions-Motiven, welche in biomedizinischen Anwendungen Einsatz finden könnten.

Tabelle 3.5. Übersicht der verwendeten wc2-[GPP]_n Peptide. wc2-[GPP]₅₀ wurde biotechnologisch hergestellt und [GPP]_{3/7} wurden mittels SPPS synthetisiert. Sequenzen, welche RGD bzw. RDG enthielten sollten in Zellkulturexperimenten herangezogen werden.

Kürzel	Sequenz
wc2-[GPP] ₅₀	SWCGTTPGSWCGT-[GPP] ₅₀
wc2-[GPP] ₃	SWCGTTPGSWCGT-[GPP] ₃
wc2-[GPP] ₇	SWCGTTPGSWCGT-[GPP] ₇
wc2-RDG	SWCGTTPGSWCGT-[GPP] ₇ -GRDGSPG
wc2-RGD	SWCGTTPGSWCGT-[GPP] ₇ -GRGDSPG

Demzufolge wurden insgesamt 5 verschiedene Konstrukte hergestellt die *N*-terminal die wc2-Domäne tragen sollten (siehe Abbildung 3.5). wc2-[GPP]₅₀ wurde über rekombinante Proteine in Produktion im Arbeitskreis Scheibel hergestellt. Dieses wurde als SUMO-gekuppeltes Kon-

ⁱⁱDie in diesem Kapitel vorgestellten Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Scheibel der Universität Bayreuth durchgeführt.

strukt in *E. coli* produziert (siehe Golser *et al.*¹⁶⁰ und Abschnitt 5.3.4). Der SUMO-Tag (*Small Ubiquitin-like Modifier*) diente dabei als Löslichkeitsvermittler und wurde im Verlauf der Herstellung mittels Ulpprotease abgespalten. Die ausführliche Synthese wird in der Veröffentlichung Golser *et al.*¹⁶⁰ und der Dissertation von Adrian Golser¹⁵⁹ beschrieben (siehe außerdem Abschnitt 5.3.4). Die kurzen Konstrukte (wc2-(GPP)_n mit n = 3, 7) wurden über Festphasenpeptidsynthese (Abschnitt 5.3.1) hergestellt.

3.6.1 Einfluss von Oxidation und Reduktion auf die wc2-Domäne

Die untersuchten Peptide trugen alle am *N*-Terminus die wc2-Domäne, bestehend aus 13 Aminosäuren. Diese enthält, wie auch in Abschnitt 3.4 beschrieben, zwei Cysteinreste gefolgt von der kollagenartigen Sequenz $[GPP]_x$ unterschiedlicher Länge. Nach Oxidation bilden die Cysteine der wc2-Domäne Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Peptidsträngen aus. Dabei erfolgte die Oxidation durch Inkubation der Peptide über Nacht unter oxidierenden Bedingungen (siehe 5.8.4). Auch bei diesen Untersuchungen sollte die Behandlung mit Wasserstoffperoxid die vollständige Oxidation der Peptide sicherstellen (vgl. Abschnitt 3.5). CD-Spektroskopie wurde wie in Abschnitt 5.8.5 beschrieben durchgeführt und dient wie zuvor als Methode der Wahl um eine erfolgreiche Dreifachhelixbildung der CMPs nachzuweisen. Alle drei Konstrukte ($[GPP]_x$, $x = 3, 7, 50$) zeigten nach Oxidation sowie Equilibrierung über Nacht ähnliche CD-Spektren, welche entsprechende Charakteristika kollagenartiger Peptide aufwiesen (Siehe Abbildung 3.26)ⁱⁱⁱ. Es ist an dieser Stelle wichtig zu erwähnen, dass wc2- $[GPP]_{50}$ nur in einem Puffer mit Guanidinhydrochlorid mit Konzentrationen über 4 mol/L löslich war. Der denaturierende Effekt von Guanidinhydrochlorid kann sich zwar auf die Helixbildung und Stabilität dieser auswirken,¹⁴⁴ jedoch führte eine Verringerung dieses Denaturierungsmittels zu Aggregation bzw. einem Gelieren der Peptide. Die gebildete dreifach-helikale Struktur konnte von allen Konstrukten aufrechterhalten werden, selbst nach einem Zusatz von TCEP (10 molarer Überschuss). Anschließendes Aufheizen der Proben führte jedoch zu vollständiger Entfaltung. Durch ein erneutes schnelles Abkühlen konnte die dreifachhelikale Struktur nicht wieder hergestellt werden (1 °C/s). In Abbildung 3.27 ist das Schmelzverhalten der Konstrukte dargestellt. Sobald die Entfaltung durch Aufheizen eingeleitet wurde, ist dies durch ein kontinuierlich verlaufenden Signalverlust bei 227 nm zu erkennen. Durch anschließendes Abkühlen der oxidierten Proben lies sich dieses Signal wieder herstellen, was auf eine Rückbildung der Dreifachhelix schließen lässt. Dies lässt sich vermutlich auf die durchgängig intakte Cystein Quervernetzung zurückführen.

ⁱⁱⁱDie Messungen der wc2-Peptide wurden aus der Veröffentlichung Golser *et al.*¹⁶⁰ reproduziert, die im Rahmen der Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Scheibel der Universität Bayreuth angefertigt wurde. Daraus resultiert die Darstellung der wc2- $[GPP]_{50}$ Peptide in mdeg.

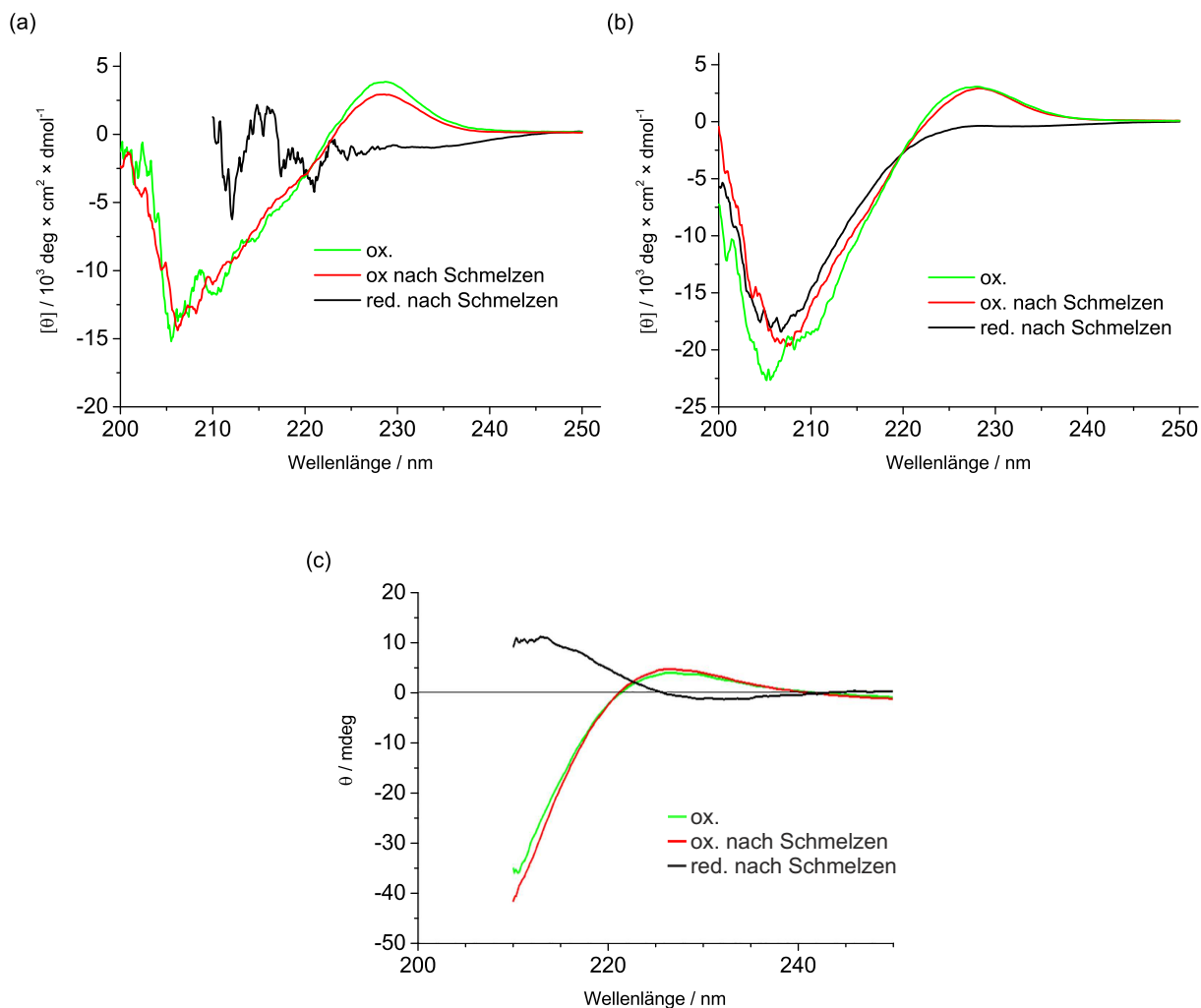


Abbildung 3.26. Circulardichroismus Spektroskopie der Konstrukte wc2-[GPP]₃ (a), wc-[GPP]₇ (b) und wc2-[GPP]₅₀ (c); Charakteristische Kollagendreifachhelix kann durch ein positives Signal bei ~ 227 nm mittels CD-Spektroskopie identifiziert werden; Bedingungen: wc2-[GPP]_{3/7}: 0.3 mg/mL in 0.1 M PBS Puffer, bei 4 °C und wc2-[GPP]₅₀ 0.3 mg/mL in 4 M Gdn·HCl bei 20 °C. (ox. = Cysteinreste liegen oxidiert vor; red. = Cysteinreste wurden durch TCEP (10 mM) reduziert.)

Das oxidierte wc2-[GPP]₇ Peptid zeigte eine kooperative Entfaltung mit einem Schmelzpunkt von 37.3 °C (ermittelt durch Boltzmann Fit). Das Peptid wc2-[GPP]₃, als auch das Protein wc2-[GPP]₅₀, zeigten dieses Verhalten nicht, was darauf hindeutet, dass die zugrundeliegenden quaternären Eigenschaften variieren. Nach Reduktion der Konstrukte wurde das initiale positive Signal bei 227 nm zwar abgeschwächt, war aber weiterhin präsent. Aufheizen der reduzierten Proben (wc2-[GPP]_{3/7}) zeigten schnelles vollständiges Entfalten bei 8 °C für wc2-[GPP]₃ und

14 °C für wc2-[GPP]₇, was durch den Nulldurchgang der Elliptizität bei 227 nm ermittelt werden konnte. Das Protein wc2-[GPP]₅₀ zeigte einen Nulldurchgang von 47 °C (siehe Abbildung 3.27c) und ein kooperatives Entfalten mit einem Schmelzpunkt von 54.5 °C (ermittelt durch Boltzmann Fit). Dies weist auf eine außergewöhnliche thermische Stabilität hin, die im Bereich des

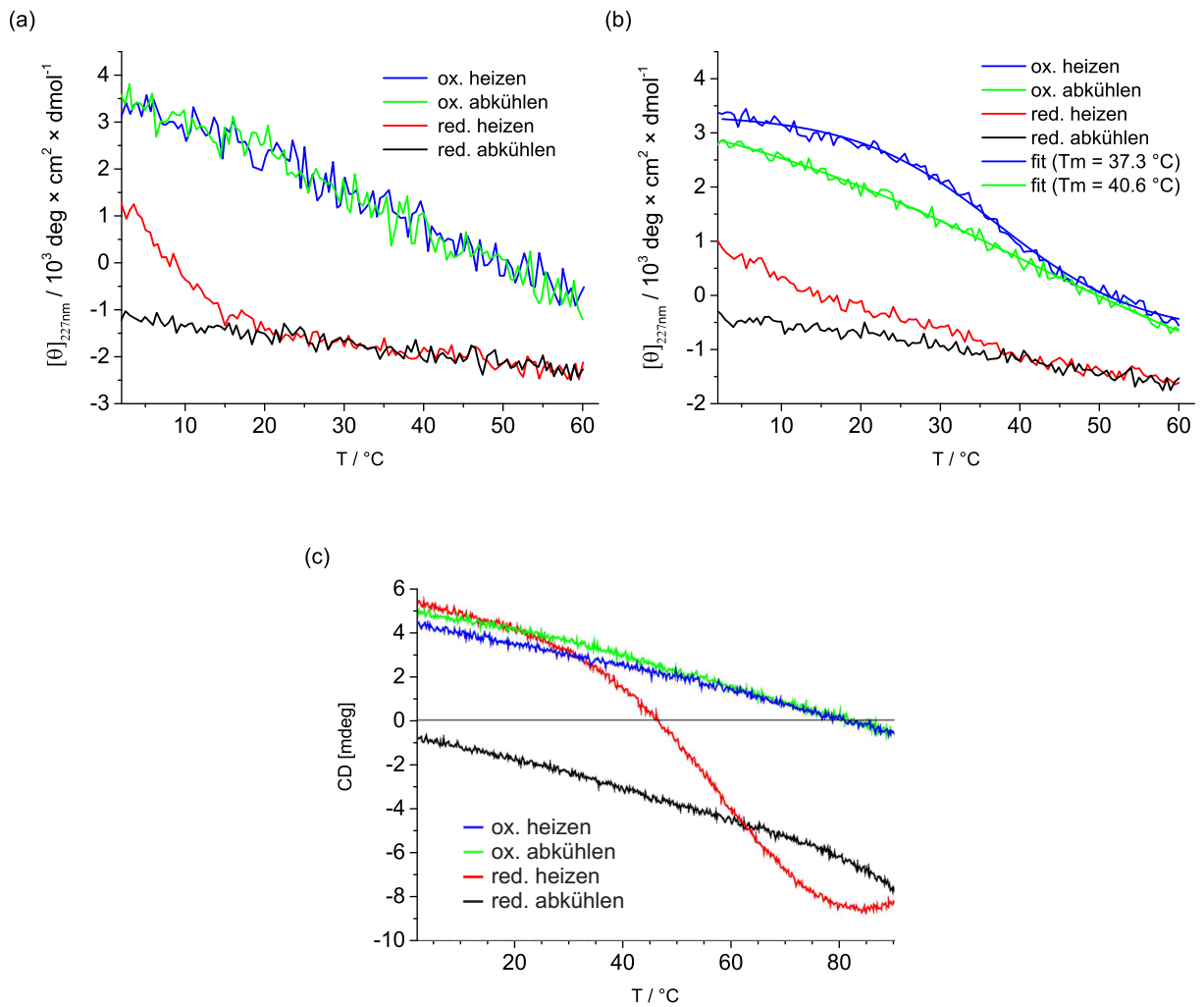


Abbildung 3.27. Schmelzverhalten der wc2-[GPP]_n Konstrukte, (a) wc2-[GPP]₃, (b) wc2-[GPP]₇ und (c) wc2-[GPP]₅₀ unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. (a) und (b) wurden unter nativen Bedingungen in PBS gemessen, (c) unter Zusatz von 4 M Guanidinhydrochlorid.

natürlichem Kollagen liegt. Vor allem da die, für die Löslichkeit erforderliche, Anwesenheit von Guanidinhydrochlorid vermutlich einen destabilisierenden Effekt auf die Helix ausübt. Zusätzlich muss hier, bei einem Vergleich mit natürlichen Kollagen, die Abwesenheit von Hydroxyprolin beachtet werden, welches maßgeblich zu einer hohen thermischen Helixstabilität beiträgt.¹⁶¹

3.6.2 Grad der Oligomerisierung - Mehrwinkel-Lichtstreuung

Der Einfluss der wc2-Domäne auf die Stabilität der $[\text{GPP}]_n$ Abschnitte konnte durch Schmelzuntersuchungen oxidierten und reduzierten Peptide gezeigt werden. Im Folgenden wird untersucht ob es sich bei den helikalen Strukturen um einzelne Trimere, übergeordnete Netzwerke, Fibrillen oder intermediäre Strukturen handelt. Um den direkten Einfluss der wc2-Domäne auf die molekulare Struktur der Peptide zu untersuchen, wurden SEC-MALS (Größenausschluss Chromatographie (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) gekoppelt mit Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS, *Multi Angle Light Scattering*) Experimente unter Verwendung von wc2- $[\text{GPP}]_3$ durchgeführt (siehe Abbildung 3.28).

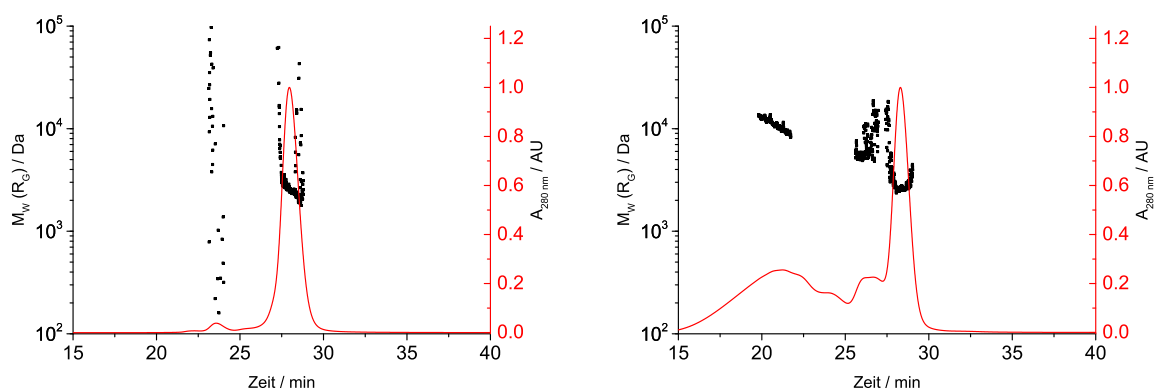


Abbildung 3.28. SEC-MALS-Messungen von wc2- $[\text{GPP}]_3$ unter reduzierenden (links) und oxidierenden Bedingungen (rechts); rote Line: UV-Absorbanz bei 280 nm, schwarz gepunktet: M_W ermittelt durch MALS.

Das kurze wc2- $[\text{GPP}]_3$ Konstrukt wurde ausgewählt, da die Schmelzexperimente (Abbildung 3.27) den Rückschluss erlauben, dass die Vororganisation dieser Peptide bei Raumtemperatur hauptsächlich durch die wc2-Domäne und nicht durch den $[\text{GPP}]_3$ -Abschnitt hervorgerufen wird. Messung des reduzierten Peptids zeigte die Elution eines einzelnen Peaks bei 28 min durch die starke Absorbanz bei 280 nm, was auf die Anwesenheit des Tryptophanrest schließen lässt, welcher in den Konstrukten enthalten ist. MALS ergibt einen Gyrationradius (R_G) korrespondierend zu einer molekularen Masse von 2.5 kDa, was recht gut mit der berechneten Masse von 2095 Da des Peptidunimers übereinstimmt. Zudem ist ein kleiner Peak bei 23.5 min zu erkennen, dem keine genaues MALS Signal bzw. R_G zugeordnet werden konnte. Unter oxidierenden Bedingungen konnte der selbe Peak beobachtet werden, dem auch eine gleiche Masse von ca.

2.5 kDa zugeordnet werden konnte. Es sind aber auch schneller eluierende Peaks zu erkennen, denen eine höhere Masse zugeordnet werden kann. Der Peak-„Schulter“ zwischen 25.6 - 26.6 min kann, mittels MALS, eine durchschnittliche Masse von 6.4 kDa zugeordnet werden. Die starke Schwankung des Signals in diesem Bereich lässt den Schluss zu, dass es sich hier um eine gemeinsame Elution von Dimer und Trimer handelt. Ein weiterer, sehr breiter Peak, um 21 min zeigte höhere Molekularmassen zwischen 8.2 und 13.6 kDa. Es kann angenommen werden, dass es sich hierbei um oligomere Strukturen von Trimeren und höher vernetzten Produkten handelt. Diese Ergebnisse liegen sehr gut im Einklang mit denen aus Abschnitt 3.5 (Abb. 3.22), welche ebenso Hinweise auf eine höhere Quervernetzung der Peptide liefern. Es liegt somit der Schluss nahe, dass die wc2-Domäne neben Dimeren hauptsächlich die Bildung von Oligomeren anstelle von reinen Trimeren induziert wird. Es ist weiterhin anzunehmen, dass in den größeren Konstrukten die Vernetzung der Peptide geringer ausfällt, verglichen mit wc2-[GPP]₃, da hier der Anteil an kollagenartiger Struktur höher ist. Allerdings sollte es sich bei zunehmender Peptidlänge auch nicht um reine Trimere handeln sondern um ein Netzwerk, welches sich durch die oxidative Verknüpfung von Cysteinen sowie der Ausbildung von lokalen, kurzen Tripelhelices auszeichnet. Auf Grund des starken stabilisierenden Effekts der oxidierten wc2-Domäne, ist eine hochgradig vernetzte Struktur mit hohem Anteil an Trimeren zu erwarten.

3.6.3 Rasterkraftmikroskopie

Diese Annahme, dass es sich bei den wc2-[GPP]_n Konstrukten um stark vernetzte Strukturen handelte, konnte durch Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy* - AFM) bestätigt werden (Abb. 3.29 C). Aufnahmen von oxidierten wc2-[GPP]₅₀ zeigten schwammartige Strukturen in der Größe von mehreren µm. Es ist anzunehmen, dass unter oxidierenden Bedingungen eine Vernetzung von Disulfidbrücken in Dimere, Trimere und Oligomere stattfindet. Diese „Knoten“ bringen unstrukturierte GPP Wiederholungen in räumliche Nähe und funktionieren als Nukleierungsstelle für die Ausbildung von Dreifachhelices. Aufnahmen reduzierter wc2-[GPP]₅₀ Peptide lieferten lediglich eine saubere Glimmer(Mica)-Oberflächen. Dies ist vermutlich auf die Bildung von stark verdichteten Aggregaten zurückzuführen, die sich durch schwache Wechselwirkungen mit der Glimmer-Oberfläche im Waschschrift ablösen. Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zu den fibrillären Strukturen die bei der langsamen Anordnung von wc2-[GPP]₇ unter reduzierenden Bedingungen gebildet wurden. Es konnten einzelne Fibrillen mit einer Länge in der Größenordnung von 25 bis 500 nm beobachtet werden (Abb. 3.29 A). Die Länge einer GPP Wiederholung liegt bei ca. 8.6 Å,¹⁶² somit können die beobachteten Fibrillen nur durch überlappende [GPP]₇ Monomere gebildet werden. Das lässt zudem die Schlussfolgerung zu, dass der wc2-Abschnitt keine sterische Hinderung bezüglich der Bildung und des Wachstums der Dreifachhelix verursacht. Die Fibrillen weisen eine Höhe von ca. 2 nm im AFM Höhenprofil (Abb. 3.29 D) auf, was in dem Größenbereich einer einzelnen Tropokollagenhelix (1.5 nm) liegt.^{163,164} Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den beobachteten Strukturen um kollagenartige Dreifachhelices mit fibrillärer Morphologie handelt. Zudem kann angenommen werden, dass es sich hierbei um supramolekulare Strukturen handelt, ähnlich derer, die für funktionalisierte kollagenartige Peptide beschrieben wurden.^{12,125,165,166} Die hier erhaltenen Strukturen wurden aber ohne aktive funktionale Domänen erhalten. Die Strukturen müssen lediglich über eine Tripelhelix verbunden sein, da keine Quervernetzungen vorhanden sind. Die oxidierten wc2-[GPP]₇ Peptide zeigten in den AFM- Messungen keine Ausbildung von Fibrillen (Abb. 3.29 B). Wird davon ausgegangen, dass [GPP]₇ eine Länge von ca. 6 nm und eine Höhe von 2 nm aufweist, sind diese Befunde zu erwarten, da es sich bei diesen vermutlich um globuläre bzw. ellipsoide Strukturen handelt. Diese weisen eine granulare Oberflächenbeschichtung mit einer Oberflächen-

rauigkeit von R_a 0.143 nm auf, was einen Einfluss der kovalent vernetzten wc2-Sequenzen auf die Assemblierung der Peptide nahelegt.

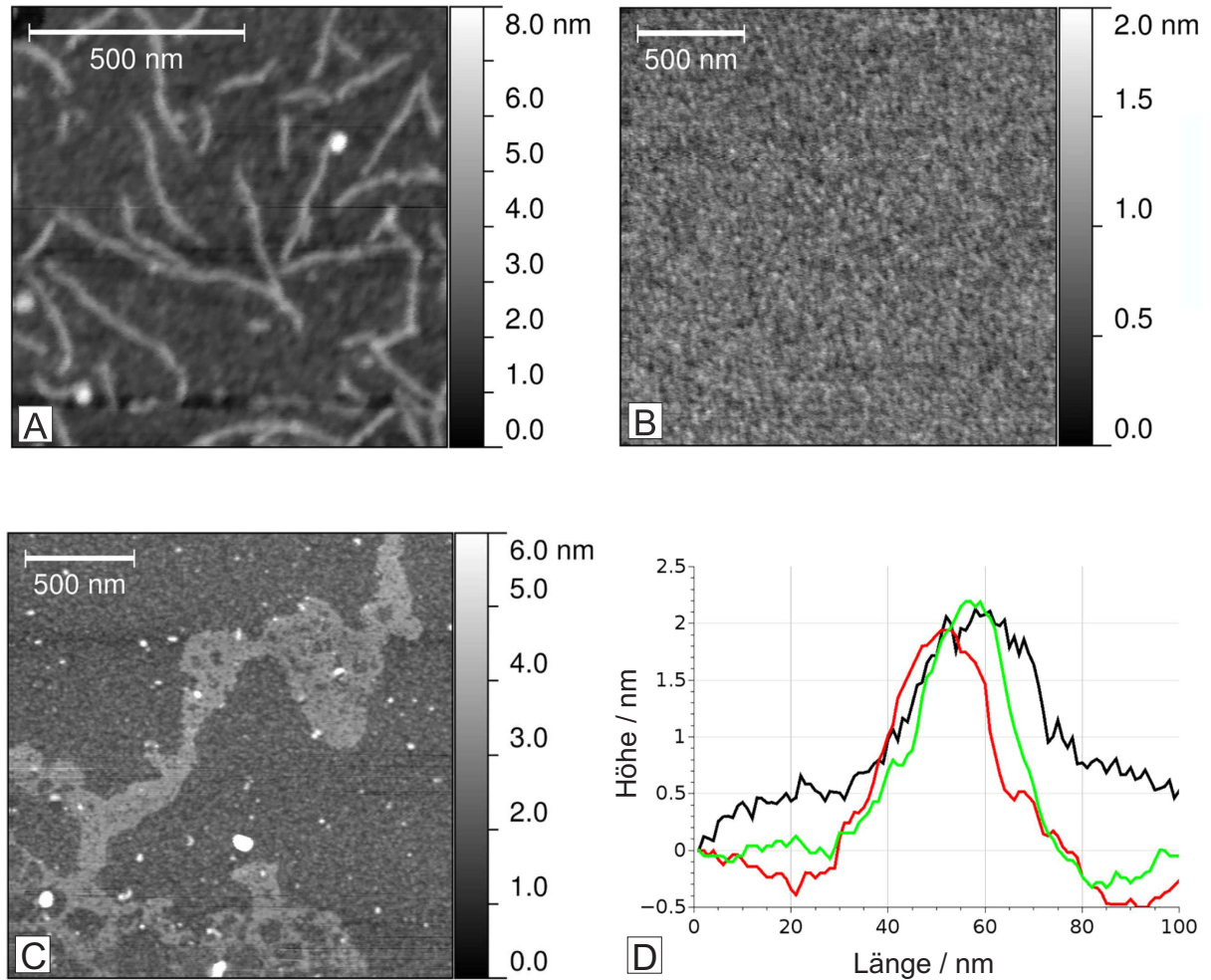


Abbildung 3.29. AFM Aufnahmen von (A) wc2-[GPP]₇ unter reduzierten, (B) wc2-[GPP]₇ unter oxidierenden Bedingungen. (C) zeigt Col-wc2-(GPP)₅₀ präpariert in einer Lösung von 4 M Guanidinhydrochlorid unter oxidativen Bedingungen. (D) zeigt die Höhenprofile drei verschiedener Fibrillen von (A).

3.6.4 Zellkulturversuche

Zellkulturexperimente unter Verwendung verschiedener Zelltypen wurden durchgeführt, um die Biokompatibilität der wc2-GPP Peptide zu untersuchen. Die Adhäsion der Zelllinien BALB 3T3 (Fibroblasten), B50 (neuronale Zellen) und RN22 (Schwannzellen) auf oxidierten Filmen von wc2-[GPP]₅₀ wurde über 7 Tage untersucht (Abbildung 3.30). Fibroblasten bilden einen großen zellulären Anteil in der extrazellulären Matrix und es könnte somit erwartet werden, dass die Zellen nach mehreren Tagen der Inkubation die stärkste Interaktion mit der Kollagenmatrix zeigen und diese eventuell digieren. Allerdings konnte dieses Verhalten nicht beobachtet werden. B50- und RN22-Zellen wurden auf ihre Verträglichkeit mit den wc2-Konstrukten getestet, um die mögliche zukünftige Anwendbarkeit als Bestandteil in künstlichen Nervenführungsleitungen zu beurteilen.¹⁶⁷ Proteinfilme aus wc2-[GPP]₅₀ wurden aus Ameisensäure hergestellt und ausgiebig mit PBS gewaschen, bevor sie für die Zellkulturanalyse verwendet wurden.

Es ist offensichtlich, dass alle Zelllinien zur keiner Adhäsion an den unstrukturierten Kollagenfilmen führten. Mikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die meisten Zellen während des Zellmediumaustauschs abgewaschen wurden und dass die restlichen Zellen keine starken Wechselwirkung mit dem Proteinfilm zeigten, was zu einer Ausbreitung der Zellen führen würde. Im Gegensatz zum Proteinkonstrukt wc2-[GPP]₅₀ konnten die kurzen Peptide (wc2-[GPP]₃ und wc2-[GPP]₇) sowohl aus oxidierten, als auch aus reduzierten Zuständen aus wässrigen Lösungsmitteln hergestellt werden. Die aus dreifach-helikalen kurzen Peptiden hergestellten Filme waren mehrere Tage in PBS stabil, konnten jedoch nach Abschluss des Zellkulturexperiments nicht mehr nachgewiesen werden. Filme aus wc2-[GPP]₇-RGD zeigten ähnliche Resultate. Dabei ist nicht klar, ob die Peptide erneut gelöst oder enzymatisch verdaut wurden. Die Zellen zeigten eine schwache Adhäsion und eine nicht zu unterscheidende Proliferation. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde wc2-[GPP]₅₀ mit wc2-[GPP]₇-RGD (9:1 w/w) gemischt und auf Adhäsion mit BALB-Fibroblasten getestet (Abbildung 3.30D +RGD). Als Kontrolle wurden Filme aus wc2-[GPP]₅₀ mit 10% wc2-[GPP]₇ vermischt (Abbildung 3.30D +[GPP]₇), welche ähnliche Ergebnisse wie Filme aus wc2-[GPP]₅₀ zeigten. Im Gegensatz dazu wurde ein deutlicher Unterschied beim Mischen von wc2-[GPP]₅₀ mit wc2-[GPP]₇-RGD deutlich. Das RGD-Bindungsmuster wird leicht auf der Oberfläche des Films präsentiert und dient zur Förderung der Adhäsion von Fibroblasten. Das

RDG-Motiv hingegen, das aus den gleichen Aminosäuren aber einer vertauschten Reihenfolge besteht, diente als negative Kontrolle und zeigt schwächere Adhäsion nach 4 Tagen. Daraus ergibt sich der Schluss, dass die Bindung spezifisch ist und keine Ursache von Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen oder Änderungen in der Oberflächenmorphologie. Die in Abbildung 3.30 **E** und **F** gezeigte Zellmorphologie stimmt mit diesen Befunden überein. Der Film aus wc2-[GPP]₅₀ **E** förderte kein Zellwachstum während die Zellen auf dem Film aus wc2-[GPP]₅₀ + wc2-[GPP]₇-RGD **F** Adhäsionspunkte mit typischer Zellverteilung zeigten. Es ist bekannt, dass RGD Peptide (Arg-Gly-Asp) Zelladhäsion fördern, da sie einen hohen Einfluss die Ligandenspezifität anhaftender Zellen haben.¹⁶⁸ Das Gemisch aus wc2-[GPP]₅₀ + wc2-[GPP]₇-RGD stellt vermutlich den geeignetsten Oberflächenabstand für ein Zellwachstum bereit. Da die häufigsten Kollagenbindungsintegrine ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ und $\alpha11\beta1$)¹⁶⁹ eher spezifische Adhäsionsdomänen binden als dreifach-helikale CMPs ist es nicht verwunderlich, dass Fibroblasten nicht ausreichend an nicht funktionalisiertem, modifiziertem Kollagen hafteten. Es ist dennoch wichtig hervorzuheben, dass die wc2-Peptide selbst nicht zytotoxisch sind. Dies konnte durch den Einbau des integrinspezifischen RGD-Zelladhäsionsmotiv gezeigt werden, da bei diesen Experimenten Fibroblasten an hergestellten Filmen hafteten und sich gut ausbreiteten. Im Gegensatz dazu waren Filme, die nur aus wc2-[GPP]₇-RGD hergestellt wurden, für die Dauer des Experiments instabil, und zeigten keine bessere Haftung als die unbehandelte Gewebekulturplatte. Dies hebt die Rolle von wc2-[GPP]₅₀ als biokompatible Oberflächenbeschichtung mit variabler Funktionalisierung hervor. Zellen auf den gemischten Filmen zeigten während der Dauer des Zellkultur-Experiments eine gute Vitalität und Proliferation, was darauf hindeutet, dass konstruierte Kollagene ein praktikabler Rahmen für die Entwicklung von biotechnologisch hergestellten Biomaterialien mit kontrollierbaren Eigenschaften sind.

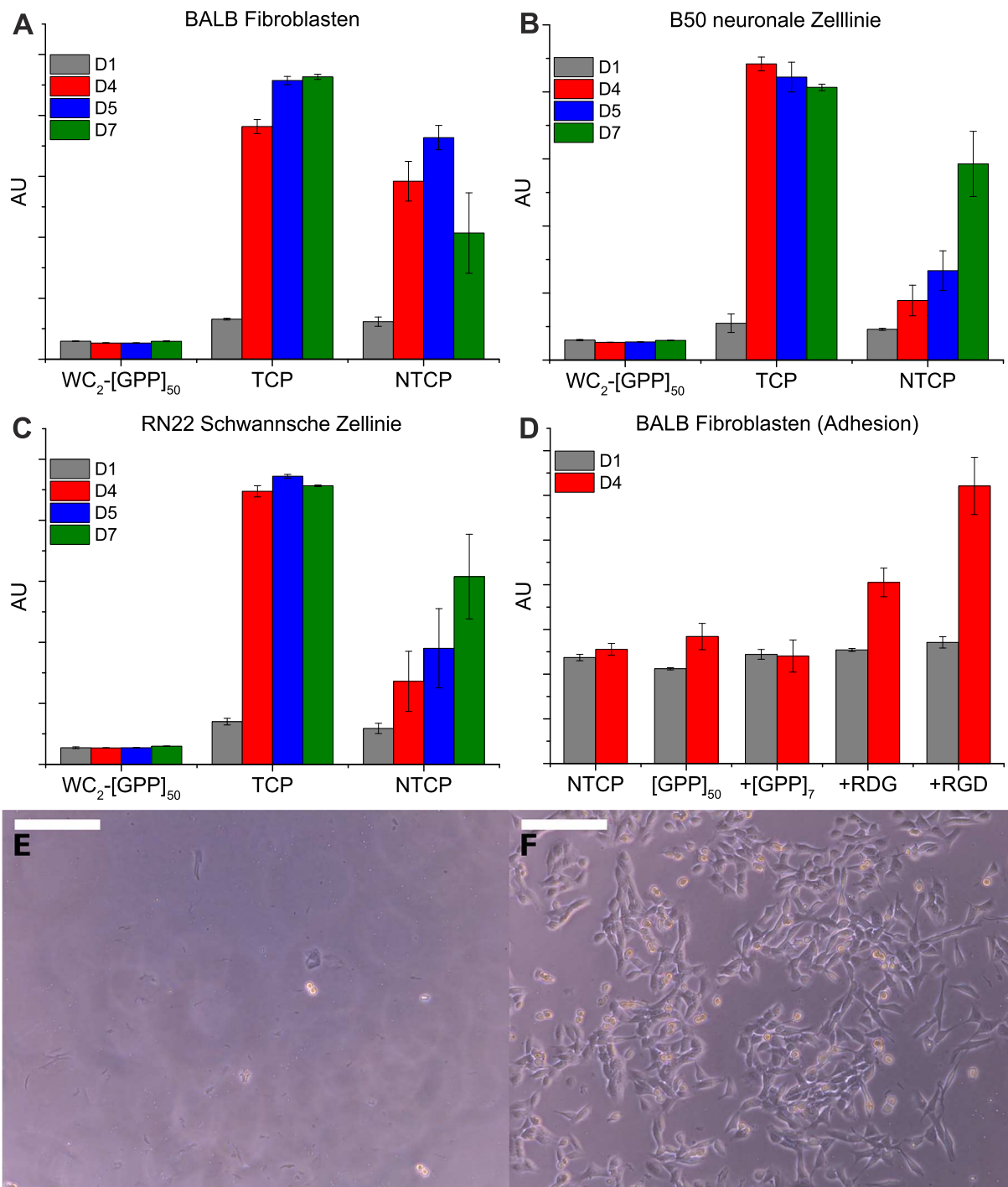


Abbildung 3.30. (A-C) -Zellproliferationstests verschiedener Zelllinien (BALB Fibroblasten, RN22 und B50 neuronale und schwannsche Zellen) auf oxidiertem wc2-[GPP]₅₀. (TCP = behandelte Kulturplatte/*treated culture plate*; NTCP = nicht behandelte Kulturplatte/*nontreated culture plate*); (D) Zellproliferationstest, der den Einfluss der eingeführten spezifischen Funktionalität durch Mischen der wc2-[GPP]₅₀ mit kurzen wc2-Peptiden zeigt, die das RGD-Motiv enthalten. Wenn unmodifiziert, zeigten wc2-[GPP]₅₀ und wc2-[GPP]₅₀ + wc2-[GPP]₇ basierte Peptidfilme an Tag 4 keine Adhäsion, wohingegen der Einbau eines RGD-Motivs die Bindung vermittelte, gefolgt von der Proliferation. Dieser Effekt ist offensichtlich, wenn man die Morphologie von Zellen vergleicht, die an (E) wc2-[GPP]₅₀ und (F) wc2-[GPP]₅₀+ [GPP]₇-RGD an Tag 3 gemischt, wuchsen (Skalenstrich entspricht 200 µm).

4 Zusammenfassung und Ausblick

Natürliches Kollagen aus verschiedenen Quellen und unterschiedlicher Morphologie wird seit Langem als biokompatibles Material verwendet, das die Wundheilung und Geweberegeneration unterstützen kann. Die Nachahmung der Struktur von natürlichem Kollagen und somit dessen strukturellen Eigenschaften, wie z. B. Zugfestigkeit und Biokompatibilität, eröffnete das Gebiet der kollagenartigen Peptide. Allerdings stellt die einzigartige Struktur des Kollagens Herausforderungen an die chemische und biochemische Synthese von artifiziellen Peptiden. So ist zum Beispiel die Anordnung der Peptideinzelstränge in kollagenartige Dreifachhelices, auf Grund der repetitiven Aminosäureabfolge, schwer zu steuern. In dieser Arbeit wurden verschiedene Konzepte vorgestellt, um Peptideinzelstränge in die Anordnung kollagenartiger Dreifachhelix zu dirigieren. Dabei wurden Ansätze zur Vororganisation der Peptide mit einem schaltbaren Struktursegment zur Induktion der Kollagen-Dreifachhelix kombiniert. Bei den untersuchten Strategien zur Vororganisation von Peptiden handelte es sich zum einen um Organo-Templat und zum anderen um Cystein-Knoten. Die templatbasierte Strategie beruht auf einem dreiar-migen Gerüstmolekül an, das drei Peptideinzelstränge geknüpft werden. Als Ligationstechnik wurde die native chemische Ligation ausgewählt und deren Ligationsbedingungen optimiert. So konnte die direkte Ligation an das Templat mit einem erweiterten Templat verglichen werden.

Parallel zur Templat-Strategie wurde die Strategie der Assemblierung mehrerer Peptidstränge über Bildung von Cystein-Knoten verfolgt und optimiert. Die entwickelten Kollagen-Mimetischen-Peptide (CMPs) bestehen aus einer Cystein-reichen Domäne (wc2-Domäne) und einem Abschnitt, der eine kollagenartige Sequenz von $[\text{Gly-Pro-Pro}]_x$ aufweist. Das wc2-Foldon ermöglicht eine Vororganisation der Peptide und nukleiert die Faltung in Kollagendreifachhelix-Motiven. Die Auswahl der beiden Vororganisationssysteme erfolgte mit dem Hintergrund, zusätzlich die Einbringung Schaltbarer DEPSI Segmente zu ermöglichen. Das organische Templat als auch der Schalterdefekt zeigten maßgebliche Auswirkungen bezüglich Adaption der Peptide in kollagenartige Dreifachhelices, was mittels Langzeit-Äquilibrierung und pH-Anstiegsexperimente bestätigt werden konnte. Die Äquilibrierung bei pH 5 verhinderte die Faltung der Peptide in eine Kollagen-Tripelhelix (CTH). Nach Änderung auf pH 7.4 konnten mittels Schaltpeptiden die

CTH-Motive wesentlich schneller erreicht werden. Gerüstgebundene Konstrukte mit und ohne Schalter, sowie entsprechende Kontrollen von nicht-gebundenen Peptidsträngen wurden durch CD-Spektroskopie verglichen. Strukturschmelz-Experimente stützten die allgemeine Annahme, dass der Schalter offensichtlich zur Bildung von perfekteren CTH-Motiven beiträgt.

Die synthetisch leichtere Zugänglichkeit des Cysteinknotensystems ermöglichte hingegen die Untersuchung von Positionseffekten der DEPSI Segmente. Die Peptide wurden systematisch an verschiedenen Positionen durch eingebrachte DEPSI-Segmente gestört. Abhängig von der Position modulieren die Schalterdefekte die wc2-Organisation, die Nukleierung und den CTH-Faltungsprozess. Es stellte sich heraus, dass die Einbringung eines *C*-terminalen Defekts zu einem reißverschlussartigen CTH-Bildungsprozess beiträgt, der eine schnelle und effektive CTH-Bildung förderte und zu stabileren CTH-Strukturen führte. Diese Cystein-Organisationsdomäne, welche in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Scheibel der Universität Bayreuth entwickelt wurde, hatte den Vorteil, dass derartige Sequenzen ohne chemische Modifikation direkt im biotechnologischen Prozess in Unimere eingebracht werden konnten. Eine *E. coli*-basierte Produktionsstrategie ermöglichte den Zugang zu [GPP]₅₀-Konstrukten, die ebenfalls die wc2-Domäne trugen. Weitere Untersuchungen wiesen zudem eine redox-reaktive Schaltbarkeit der Peptide nach.

Um die Verwendbarkeit der synthetischen Kollagene als Biomaterial zu testen, wurde die Kompatibilität in zweidimensionalen Adhäsions- und Zytotoxizitätstests überprüft. Es stellte sich dabei heraus, dass die Zelladhäsion, für unmodifizierte Filme schwach ist. Dies lässt sich vermutlich auf den Mangel an Integrin-Bindestellen zurückführen und stellt eine hervorragende Eigenschaft für die Verwendung als Biomaterial dar, bei dem eine übermäßige Zellinteraktion nicht erwünscht ist. Die mangelnde Interaktion mit Zellen beruhte jedoch nicht auf toxischen Effekten, da die Einführung eines *C*-terminalen Zelladhäsionsmotivs an kurzen wc2-[GPP] Peptiden die Integrin-Adhäsion begünstigt und das zelluläre Wachstum nicht hemmt.

In weiterführenden Arbeiten könnten zum Beispiel weitere Kombinationen von kurzen und langen wc2-[Gly-Pro-Pro]_x Konstrukten erfolgen. Wie gezeigt kann solch eine Kombination gezielt ausgenutzt werden, um Funktionalitäten in biotechnologisch hergestellte wc2-[GPP]₅₀-Konstrukte einzubringen. Vorstellbar wären Funktionalitäten wie die der vorgestellten DEPSI-

Peptide. Diese könnten zum einen, wie bei den kurzen GPP-Peptiden dargestellt, auch bei den wc2-[GPP]₅₀-Konstrukten zu einer erleichterten Steuerung des Faltungsprozesses beitragen und somit möglichst perfekter dreifach-helikaler Strukturen näherkommen. Zum anderen könnte durch diese gezielte Einbringung möglicherweise auch die Löslichkeit der Proteine gesteuert werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Wenn nicht anders angegeben wurden die Chemikalien ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Die N - α -Fmoc- geschützten Aminosäuren Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Pro-OH \cdot H₂O, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH \cdot H₂O, wurden von IRIS Biotech GmbH (Marktredwitz, *Germany*) bezogen. N - α -Boc- geschützte Aminosäuren Boc-L-Ser-OH und Boc-L-Pro-OH wurden von Novabiochem (Darmstadt, *Germany*) bezogen. 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) und N -Methyl-2-pyrrolidon (NMP, 99.9+%, *peptide synthesis grade*) wurden von IRIS Biotech GmbH bezogen. N,N -Diisopropylethylamin (DIPEA; Acros, *peptide grade*), Piperidin (Acros, *peptide grade*), Triethylsilan (TES; Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany, 98+ %) und Bernsteinsäureanhydrid (VWR) wurden wie bezogen eingesetzt. 1,2-Ethandithiol (EDT, ≥ 98 %), Tris(2-aminoethyl)amin (TREN), Pyridin, N,N' -Diisopropylcarbodiimid (DIC), Pyridin, N -Methylimidazol (NMI), 2,2,2-Trifluorethanol (TFE), p -Acetamidothiophenol (≥ 90 %), Acetylchlorid, Zitronensäure Monohydrat, wurden von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103, USA bezogen. Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), Wasserstoffperoxid (30 %), Essigsäure (ROTIPURAN® 100 %, p.a.), Essigsäureanhydrid (Ac₂O, ROTIPURAN® ≥ 99 %) und Dioxan (≥ 99.5 %) wurden von Carl Roth GmbH, Bielefeld, *Germany* bezogen. α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (α -CHCA; 97 %) wurde von Acros Organics (Geel, Belgien) bezogen.

Trifluoressigsäure (TFA; Acros, *peptide grade*) und Diethylether (Et₂O, *technical grade*, Stockmeier Chemie GmbH, Schwerte, Germany) wurden vor Gebrauch destilliert. Dichlormethan (DCM, IRIS Biotech GmbH, *peptide grade*) wurde vor dem Gebrauch über CaH₂ destilliert. 2-Chlorotriethylharz mit Prolin vorbeladen (Beladung: 0.5 mmol/g), 2-Chlorotriethylchlorid Harz und Tentagel-S-RAM (Beladung 0.24 mmol/g) wurden von Rapp Polymere GmbH (Tübingen, Germany) bezogen. Acetonitril (MeCN; 99.90 %, LC-MS grade, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) und Ameisensäure (HCOOH; Fluka®, *for mass spectrometry*, 98 %, Sigma-

Aldrich) wurden wie erhalten eingesetzt. CHROMABOND® C18 ec Polypropylensäulen 730141 (Macherey Nagel), Float-A-Lyzer G2 (MWCO: 0.1-0.5 kD oder 0.5-1 kD, je 1 mL Volumen; Spectrumbioscience, Breda, Niederlande) und PBS (*phosphate buffered saline*, Sigma Aldrich) Tabletten wurden entsprechend des Standardprotokolls des Herstellers verwendet.

Die Aufreinigung von deionisiertem Wasser zu Reinstwasser erfolgte über das Reinstwassersystem Laborstar von SG Water.

5.2 Methoden

5.2.1 Peptidcharakterisierung

UPLC-MS

Die Charakterisierung der Peptide erfolgte durch analytische ultra Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (UPLC®-MS, *analytical ultra performance liquid chromatography mass spectrometry*). Die analytischen UPLC-MS Messungen wurden an einem ACQUITY-UPLC® H-Class CM Core System von Waters GmbH (Eschborn, Germany) mit einer ACQUITY-UPLC® Photodiodenzelle (PDA, *photodiode array detector*) (190-800 nm) und einem ACQUITY-UPLC®QDa Massendetektor (positiver Modus) durchgeführt. Die chromatographische Auftrennung erfolgte, falls nicht anderweitig angegeben, mit einer ACQUITY-UPLC® BEH C18 Säule (110 Å, 1.7 µm, 50 × 2.1 mm ID Waters) und ACQUITY-UPLC® BEH C18 VanGuard™ Vorsäule (110 Å, 1.7 µm, 5 × 2.1 mm ID, Waters) unter Verwendung linearer Gradienten in 4 min und einer Flussrate von 0.5 mL·min⁻¹ bei 40 °C. Alternativ wurde eine ACQUITY-UPLC® BEH C18 Säule (110 Å, 1.7 µm, 100 × 2.1 mm ID Waters) verwendet. Als mobile Phase wurde eine Binärmischung von Laufmittel A (Reinstwasser mit 0.1 % HCOOH) und B (MeCN mit 0.1 % HCOOH) verwendet. Die Gradienten sind in den entsprechenden Abschnitten der einzelnen Peptide beschrieben. UV-Vis Monitoring erfolgte bei 210 nm. Eventuelle Abweichungen von diesen Bedingungen sowie die Angabe der Gradienten werden in den einzelnen Abschnitten der Synthesen beschrieben.

MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS-Spektren wurden mit einem Bruker Autoflex Smartbeam III Gerät aufgenommen. Für die Messung wurde 1 µL der Peptidlösung zusammen mit 1 µL der Matrix (α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (5 mg/mL) in einem Gemisch von Acetonitril/Wasser (1:2 v/v, 0.1 % TFA) auf das MALDI-Trägerplatte aufgetragen.

5.2.2 Circular dichroismus Spektroskopie

Die Circular dichroismus-Spektroskopie erfolgte unter Verwendung eines temperaturkontrollierten Jasco J-815 Spektrometers mit Jasco PTC-4235/15 bei einer Temperatur von 4 °C. Es wurden 1 mm Quarzküvetten verwendet und ein Bereich von 195 nm bis 250 nm gemessen, mit einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min, bei einer Bandbreite von 1 nm und einer Antwortzeit von 4 s. Es wurden jeweils 5 Einzelmessungen akkumuliert, die Probenkonzentration lag zwischen 0.2-0.3 mg/mL.

Die Konvertierung der gemessenen Elliptizität (θ) in die mittlere Restelliptizität ("*mean residue ellipticity*", $[\theta]$) erfolgte unter Verwendung folgender Formel:

$$\text{mittlere Restelliptizität } [\theta] \text{ in } \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1} = \frac{\theta \times \text{mittlere Restmolmasse}}{\text{Weglänge in mm} \times \text{Konzentration in mg/mL}}$$

Die mittlere Restmolmasse eines Peptides ist die molare Masse geteilt durch die Anzahl der Amidbindungen des Peptides (Anzahl der Aminosäuren -1). Für die Berechnung wurde die molare Masse und die Anzahl der Amidbindungen im Peptidrückrad eines einarmigen Peptidstranges verwendet.

5.2.3 SEC-MALSⁱ

Größenausschluss Chromatographie (SEC, *Size Exclusion Chromatographie*) gekoppelt mit Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS, *Multi Angle Light Scattering*) wurde an einem Agilent 1100 series HPLC System mit Superdex 75 10/300 Säule gefolgt von einem Wyatt Technology DAWN EOS MALS Detektor durchgeführt. Peptid und Proteinkonzentration wurden mittels UV-Absorption bei 280 nm unter Verwendung des berechneten Absorptionskoeffizienten ermittelt.

ⁱMessungen wurden im Arbeitskreis Prof. Scheibel der Universität Bayreuth durchgeführt.

5.2.4 Atomkraftmikroskopie (AFM)ⁱ

AFM Messungen der getrockneten Proben wurden an einem DimensionTM 3100 mit NanoScope® V Regler (Veeco Instruments Inc., USA) im TappingMode, unter Verwendung eines Si₃N₄ Cantilevers (OMCL-AC160TS, Olympus, Federkonstante von 42 N/m, Resonanzfrequenz von 300 kHz, Tip-Radius <7 nm) durchgeführt. Für das Imaging wurde ein Tapping-Mode (Verhältnis von Sollwertamplitude zu freier Amplitude ~0.7-0.9) angewandt. AFM-Scans wurden mit NanoScope Analysis Software Version 1.40r3 (Brucker, Santa Barbara, CA) ausgewertet. wc2-[GPP]₇ und wc2-[GPP]₃ wurden in Reinstwasser auf eine *Mika*-Oberfläche aufgetragen und für einen Tag getrocknet. wc2-[GPP]₅₀ Proteine wurden in 6 M Guanidiniumthiocyanat auf *Mika* aufgetragen, nach 5 min gründlich mit Reinstwasser gewaschen und anschließend für einen Tag getrocknet.

5.2.5 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Die FTIR (Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie) Messungen wurden an einem VERTEX 70v-FTIR-Spektrometer (Bruker) mit einer evakuierbaren Optikbank durchgeführt. Die Proben wurden im ATR-IR-Modus unter Vakuum im festen Zustand gemessen.

5.2.6 Zellkulturⁱⁱ

Die Zellkulturexperimente wurden entsprechend zuvor publizierter Methoden durchgeführt.¹⁷⁰ Alle Filme basierten auf wc2-[GPP]₅₀ welches in Ameisensäure zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und in Zellkultur-Platten gegossen wurde. Dies resultierte in einer Konzentration von 0.5 mg/mL. Um spezifische Funktionalitäten einzuführen, wurde das kurze wc2-[GPP]₇ Peptid mit verschiedenen Carboxyterminalen-Funktionen ([GPP]₇, keine Funktion; RDG Negativkontrolle; RGD Zelladhesionsmotiv) mit einem Anteil von 10% (w/w) ohne weitere Behandlung hinzugefügt. Nachdem die Filme vollständig getrocknet waren wurden die Platten mit UV-Licht sterilisiert und mit den entsprechenden Zellstämmen versetzt (BALB Fibroblasten, RN22 und B50 Neuronal- und Schwannzellen) Die Zellzählung erfolgte mittels CellTiter-Blue

ⁱⁱDie Arbeiten wurden im Arbeitskreis Prof. Scheibel der Universität Bayreuth durchgeführt.

Reagenz (Promega, Madison, USA) entsprechend des Herstellerprotokolls.

5.2.7 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Die Messungen der Kernmagnetischen-Resonanzspektroskopie erfolgten an einem Bruker AvanceIII-500 Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) in 5-mm-NMR-Röhrchen und einer Temperatur von 20 °C. Zur Aufnahme der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden Messfrequenzen bei 500.13 MHz bzw. 125.76 MHz verwendet.

5.3 Synthese

In diesem Abschnitt werden die allgemeinen Synthesemethoden erläutert. Abweichungen von diesen Syntheserouten werden in den einzelnen Abschnitten der speziellen Synthesen beschrieben. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Reaktionen bei Raumtemperatur durchgeführt.

5.3.1 Allgemeine Peptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese erfolgte an einem ABI 433a Peptidsynthesizer (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Standard ABI-*Fastmoc* Protokoll (Einzelkupplung und kein Acetylierungsschritt, Abweichungen von diesen Bedingungen werden bei der Synthese der einzelnen Peptide beschrieben) mit NMP als Lösungsmittel. Für einen 0.25 mmol Ansatz wurden 41 mL Reaktoren verwendet. Das Fmoc Monitoring erfolgte mittels UV-Vis Detektor (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, *Germany*) bei 301 nm. Als feste Phase wurden ein Tentagel-PAP-Harz (Rapp Polymere GmbH, 72072 Tübingen, Deutschland) oder ein 2-Chlortriethylharz, vorbeladen mit Fmoc-Prolin, verwendet. Bei der Nutzung des mit Prolin vorbeladenen Harzes wurde die Funktionalisierung während des ersten Kupplungsschrittes verringert. Dafür wurde der erste Kupplungsschritt mit einer Kombination aus Boc-Pro/Fmoc-Pro in gleichen Anteilen von 0.5 mmol pro Aminosäure durchgeführt, was in einer aktiven Beladung von 0.25 mmol resultierte. Der Aufbau der Peptide erfolgte nach dem HBTU/NMP/Piperidin-Protokoll (siehe Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1. Peptidsynthese

Modul	Reagenzien	Zeit
Fmoc-Abspaltung	1 mL 20 % Piperidin in NMP	2×1.45 min
Waschen	2.5 mL NMP	4×0.63 min
Lösen und Aktivierung der Aminosäuren	1 mmol Fmoc-Aminosäure-OH 0.9 mmol 0.45 M HBTU in NMP 1 mL 2 M DIPEA in NMP	9.7 min
Kupplung	s.o.	45 min

Nach der abschließenden Fmoc-Entschützung wurde das Harz in einen 20 mL Spritzenreaktor überführt und gründlich mit DCM gewaschen.

5.3.2 Freisetzung der Peptide

Zur vollständigen Entschützung der Peptide und deren gleichzeitiger Freisetzung, wurde das Harz in einer Mischung aus 94 % TFA, 1 % TES, 2.5 % EDT und 2.5 % Wasser für 3 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde von der Reaktionsmischung durch Filtration getrennt und mit TFA gewaschen, mit der Reaktionsmischung vereint und unter Vakuum konzentriert. Anschließend wurden die Peptide in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert (20 min, 9000 rpm) und der Überstand abdekantiert. Die Peptide wurden in TFA gelöst und erneut gefällt. Der Niederschlag wurde unter reduziertem Druck getrocknet, in Reinstwasser/ACN (maximal 50 % ACN) gelöst und gefriergetrocknet.

5.3.3 Peptidaufreinigung

Die Aufreinigung der Peptide wurde an einem Semipräparativen *high performance liquid chromatography* (HPLC) System von Shimadzu (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany) durchgeführt. Es wurde ein BM-20A System-Controller, ein DGU-14A on-line Entgaser, eine LC-20AP flüssigchromatographie Pumpeneinheit, ein SIL-20AHT Autosampler, eine FCV-

200AL Niederdruck-gradient Einheit und ein dual UV-Vis Wellenlängendetektor SPD-10Avp mit einer präparativen Flusszelle verwendet. Die Chromatographische Trennung wurde entweder mit einer Synergi™ Fusion-RP Säule (80 Å, 4 µm, 250 × 21.20 mm ID, Phenomenex®, Aschaffenburg, *Germany*) mit einer SecurityGuard™ PREP Vorsäule (Fusion-RP 15 × 21.20 mm ID, Phenomenex) bei einer Flussgeschwindigkeit von 22.0 mL/min und bei RT oder mit einer XBridge BEH C18 OBD Prep Säule (130 Å, 5 µm, 19 mm × 150 mm, Waters GmbH Eschborn, *Germany*) mit einer XBridge BEH C18 Prep Guard Vorsäule (130 Å, 5 µm, 19 mm × 150 mm, Waters GmbH Eschborn, *Germany*) bei einer Flussrate 22.0 mL/min bei 60 °C durchgeführt. Die UV/Vis-Detektion erfolgte jeweils bei 210 nm. Als mobile Phase wurde eine Binärmischung von Laufmittel A (Reinstwasser mit 0.1 % HCOOH) und B (MeCN mit 0.1 % HCOOH) verwendet. Die Gradienten sind in den entsprechenden Abschnitten der einzelnen Peptide beschrieben. Die separierten Fraktionen wurden mit einem Shimadzu FRC-10A Fraktionssammlers aufgefangen. Abschließend wurden die Peptide gefriergetrocknet.

5.3.4 Klonierung und biotechnologische Proteinproduktionⁱⁱⁱ

Die (GPP)₅₀ kodierende Kernsequenz einschließlich Klonierungstellen an 5'- und 3'-Ende wurden bei GeneArt (Thermo Fisher) bestellt und in einen pET28a Vektor übertragen, der bereits ein SUMO-Tag¹⁷¹ kodierendes Gen enthält. Dies erfolgte unter Verwendung von molekularbiologischen Standardmethoden wie Restriktionsenzymverdau und PCR. Die wc2-Sequenz wurde später hinzugefügt, entweder durch Verwendung langer überhängender PCR-Primer oder durch Ligation kurzer doppelsträngiger Oligonukleotide, komplementär zu Überhängen, die nach Restriktionsenzymsspaltung entstanden sind.

Die Proteinproduktion wurde in dem Wirtstamm BL21(DE3) in 5 L Fermenter (Labfors 5; Infors HT Bottmingen, Schweiz) unter Verwendung von Komplexmedium durchgeführt. Die Expression wurde über Nacht mit 0.1 mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid) bei 30 °C induziert. Nach der Ernte und Waschen mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) wurden die Zellen in PBS + 4 M Guanidiniumhydrochlorid resuspendiert, durch Ultraschall oder einen Hochdruckhomogenisator lysiert und entweder auf 200 ml Nickel-NTA Säulen oder freies IMAC-Harz

ⁱⁱⁱDie in diesem Abschnitt beschriebene Synthese der [GPP]₅₀ Konstrukte wurde von A. Golser im Arbeitskreis Prof. Scheibel der Universität Bayreuth durchgeführt.¹⁵⁹

in Suspension geladen. Nach der Elution mit Imidazol, wurde das lösliche Protein gegen Puffer (PBS) in Gegenwart von Ulp-Protease dialysiert. Das $[GPP]_{50}$ -Protein, das unter naturierenden Bedingungen ausfällt, konnte zentrifugiert und in 6 M Guanidiniumthiocyanat (eingestellt auf $\text{pH } 7 \pm 0.5$) gelöst und anschließend über eine 20 ml Nickel-NTA-Säule geleitet werden. Der Säulendurchfluss dieses Schritts enthielt das erfolgreich gespaltene wc2-[GPP]_{50} , weil das freie SUMO-Tag, UlpProtease und SUMO-eCol auf dem IMAC-Harz verblieben. Das gereinigte Protein wurde anschließend gegen 10 mM Ammoniumcarbonat dialysiert, gefriergetrocknet und gelagert.

5.3.5 Synthese von TREN-(suc-Peptid)₃

Die Peptidsynthese erfolgte entsprechend des Peptidsyntheseprotokolls 5.3.1. Enthalten die Peptide ein Schaltsegment, wurden diese entsprechend der Synthese in Abschnitt 5.3.6 hergestellt. Nach Beendigung der Peptidsynthese und abschließender Fmoc Entschützung, wurde das Harz in einen 20 mL Spritzenreaktor überführt und anschließend mit NMP gewaschen (Schütteln für 2 h). Die Reaktionsmischung PyBOP/DIPEA/TREN-(suc-OH)₃ 8/20/1 Äq. (0.2 M Lösung von PyBOP in NMP) wurde in drei Schritten hinzugefügt. Nach den ersten beiden Zugaben wurde jeweils für 2 h gerührt und nach der dritten Zugabe über Nacht. Nach jeder Zugabe wurde die Reaktionslösung aus dem Spritzenreaktor entfernt und das Harz mit NMP gewaschen. Um den Umsatz weiter zu maximieren wurde eine frische und höher konzentrierte Reaktionsmischung von PyBOP/DIPEA/TREN-(suc-OH)₃ 8/20/1 Äq. (0.4 M Lösung von PyBOP in NMP) eingesetzt und für weitere 4 h geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung entfernt und das, an das Harz gebundene Produkt, gründlich mit NMP und DCM gewaschen.

5.3.6 Synthese des Schaltsegmentes -Gly(Boc)Ser-

Die Synthese des Fmoc-Gly-OH an die ungeschützte Hydroxylseitenkette des zuvor angebrachten tBoc-Ser-OH wurde in NMP mittels Spritzenreaktor durchgeführt. Die Kupplung wurde mit einer Reaktionsmischung von Fmoc-Gly-OH/DIC/NMI 10/10/7.5 Äq. durchgeführt. Die Kupplungen wurden wiederholt, um einen möglichst vollständigen Umsatz zu erreichen (mindestens 3×2 h and 1×12 h). Das Harz wurde nach jedem Kupplungsschritt mehrmals mit NMP ge-

waschen. Der letzten Kupplung folgte ein Cappingschritt (10 % DIPEA, 10 % Ac₂O in NMP, 2 × 10 min) und Fmoc-Entschützung. Anschließend wurde das Harz mit NMP gewaschen und die Peptidsynthese wurde wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 5.3.1) weitergeführt.

5.3.7 Boc-Entschützung der Schaltsegmente -Gly(Boc)Ser-

Die Boc-Entschützung der Schaltsegmente von **(22b)** (Abschnitt 5.6.4) und dem Peptid GPPG-PP-G(Boc)S-PGPPCPPGPPGPPGPPGPP (Abschnitt 5.5.4) resultiert in CMP^(+T+S) (**23**) sowie CMP^(-T+S) (**25**) und wurde wie folgt durchgeführt. Für die vollständige Boc-Entschützung wurden die Peptide in einer Mischung von 30 % TFA und 70 % DCM für 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Abspaltmischung unter Argonstrom eingeeengt und die Peptide in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert (20 min, 9000 rpm) und der Überstand abdekantiert. Die Peptide wurden in TFA gelöst und erneut gefällt, in wasserfreiem 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Die Schaltsegmente befinden sich unter diesen Bedingungen in protonierter Form und die Produkte wurden ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

5.4 Synthese der NCL-Template

5.4.1 Synthese des NCL-Templats der ersten Generation TG^{1st}

Synthese von *S*-Benzylthiosuccinat

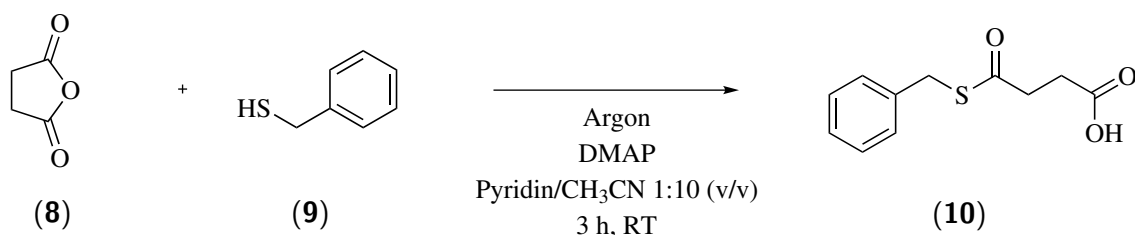


Abbildung 5.1. Synthese von *S*-Benzylthiosuccinate.¹⁷²

Benzylmercaptan (**9**) (22 mmol, 2.60 mL) wurde unter Schutzgas zu einer gerührten Lösung von Bernsteinsäureanhydrid (**8**) (20 mmol, 2.0 g) und Dimethylaminopyridin (1 mmol, 122.2 mg) in wasserfreiem Pyridin/Acetonitril (25 mL, 1:10 v/v) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 3 h gerührt und unter reduziertem Druck getrocknet. Das Produkt (**10**) wurde in eine wässrige NaHCO_3 -Lösung (30 mL, pH 8.5) überführt und zwei mal mit Diethylether (10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde im Eisbad gekühlt und mit 5 M HCl auf pH 2 eingestellt. Das farblose Präzipitat wurde abfiltriert, mit 0.1 M HCl sowie mit Eiswasser gewaschen und anschließend im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ [ppm]: 7.30 - 7.26 (m, 5 H, $5\times\text{CH}_{Ar}$), 4.15 (s, 2 H, $\text{C}_{Ar}\text{-CH}_2$), 2.91 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H, CH_2), 2.73 (t, $J = 6.8$, 2 H, CH_2).

Synthese des gemischten Anhydrids

S-Benzylthioester (**10**) (3 mmol, 672 mg) und *N*-Methylmorpholin (3 mmol, 329.84 μL in 1 mL THF) wurden unter Argonatmosphäre bei -15°C in 6 mL THF gerührt. Anschließend wurde Chlorameisensäureisobutylester (**11**) (3 mmol, 389.12 μL , in 1 mL THF) langsam hinzugetropft. Nach Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 30 min gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Produkt (**12**) in Wasser/Ethylacetat (50 mL, 3×100 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das

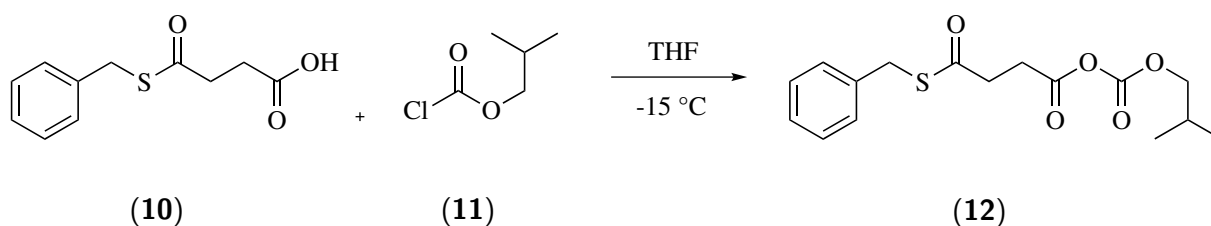


Abbildung 5.2. Synthese des gemischten Anhydrids **(12)**.

Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ [ppm]: 7.30 - 7.29 (m, 5 H, $5 \times \text{CH}_{Ar}$), 4.16 (s, 2 H, $\text{C}_{Ar}-\text{CH}_2$), 3.16 (d, $J = 6.46$ Hz, 2 H, OCH_2CH), 2.96 - 2.93 (m, 2 H, $\text{OC}-\text{CH}_2$), 2.83 - 2.81 (m, 2 H, $\text{OC}-\text{CH}_2$), 1.68 - 1.58 (m, 2 H, CH), 1.03 (d, $J = 6.89$ Hz, 3 H, CH_3), 0.83 (d, $J = 6.63$ Hz, 3 H, CH_3).

Synthese von TREN-(suc-SBzl) $_3$

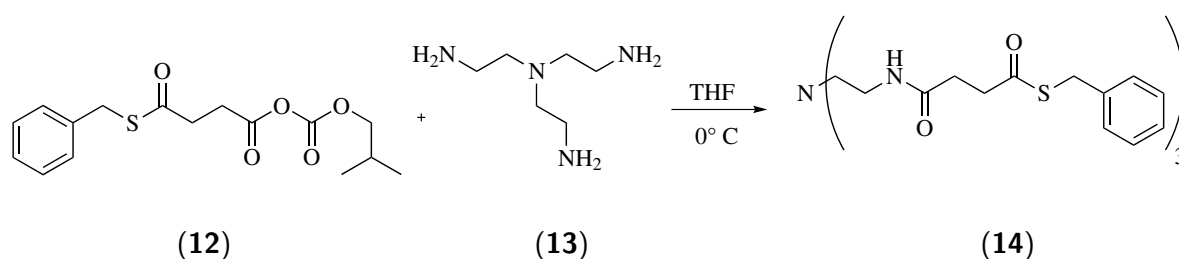


Abbildung 5.3. Synthese von TREN-(suc-SBzl) $_3$ **(14)**.

Das gemischte Anhydrid **(12)** (2.93 mmol, 951 mg) wurde in THF (8 mL) unter Argon bei 0 °C gerührt und Tris(2-aminoethyl)amin (TREN, **(13)**, 0.819 mmol, 122.77 μL , in 1 mL THF) langsam hinzugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und anschließend das Reaktionsgemisch in einen Schütteltrichter mit 50 mL Wasser überführt. Das Produkt **(14)** wurde mit Ethylacetat (3x ca. 100 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene gelblich-weiße Feststoff wurde in Ethylacetat umkristallisiert, wodurch das gewünschte Produkt TREN-(suc-SBzl) $_3$ **(14)** erhalten wurde.

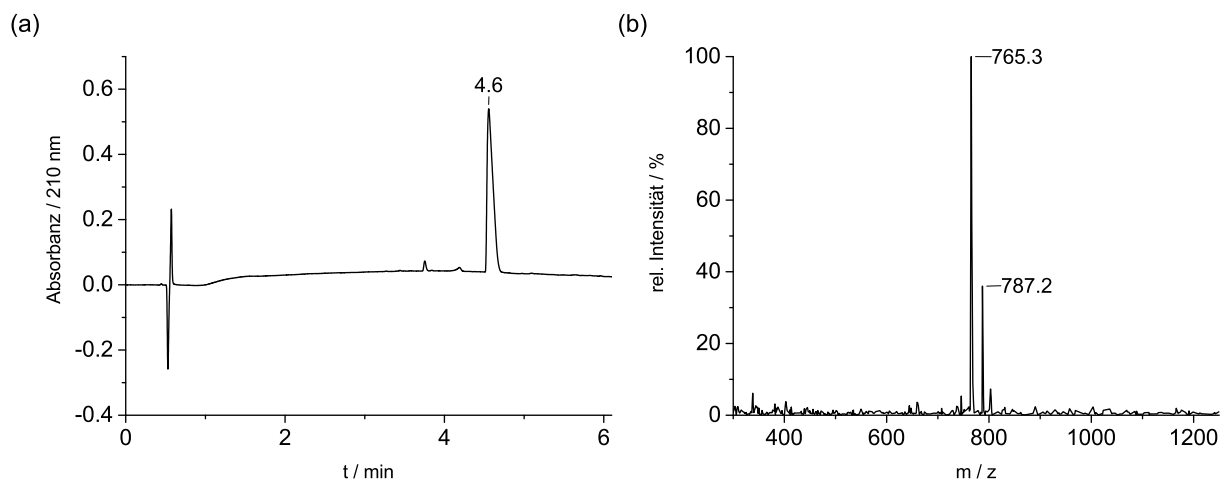


Abbildung 5.4. Charakterisierung von TREN-(suc-SBzl)₃, (a) UPLC (210 nm, 20 % B bis 90 % B, 6 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

TREN-(suc-SBzl)₃ [C₃₉H₄₈N₄O₆S₃]: 765.02 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 4.6$ min (20 % B bis 90 % B, 6 min, BEH C18 Säule (110 Å, 1.7 µm, 100 x 2.1 mm)), ESI-MS (m/z): [M+H]⁺ ber. 766.03, gef. 765.3; [M+Na]⁺ ber. 788.01 gef. 787.2.

5.4.2 Synthese des NCL-Templats der zweiten Generation TG^{2nd}

Synthese von TREN-(suc-OH)₃

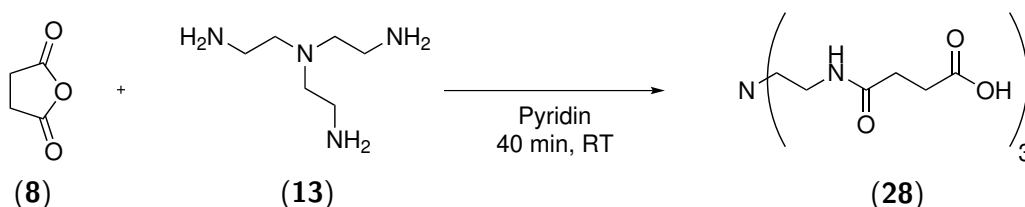


Abbildung 5.5. Synthese TREN-(suc-OH)₃ (**28**).

Tris(2-aminoethyl)amin (**13**) (TREN, 6 mmol) wurde langsam zu einer Lösung aus Bernsteinsäureanhydrid (**8**) (19.8 mmol), in Pyridin (100 mL) hinzuge tropft und für 40 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde unter reduziertem Druck aufkonzentriert, in Methanol gelöst und in kaltem Diethylether gefällt. Das farblose Produkt, TREN-(suc-OH)₃ (**28**) (2.54 g, 90 % Reinheit) wurde durch Filtration aufgefangen und unter reduziertem Druck getrocknet.

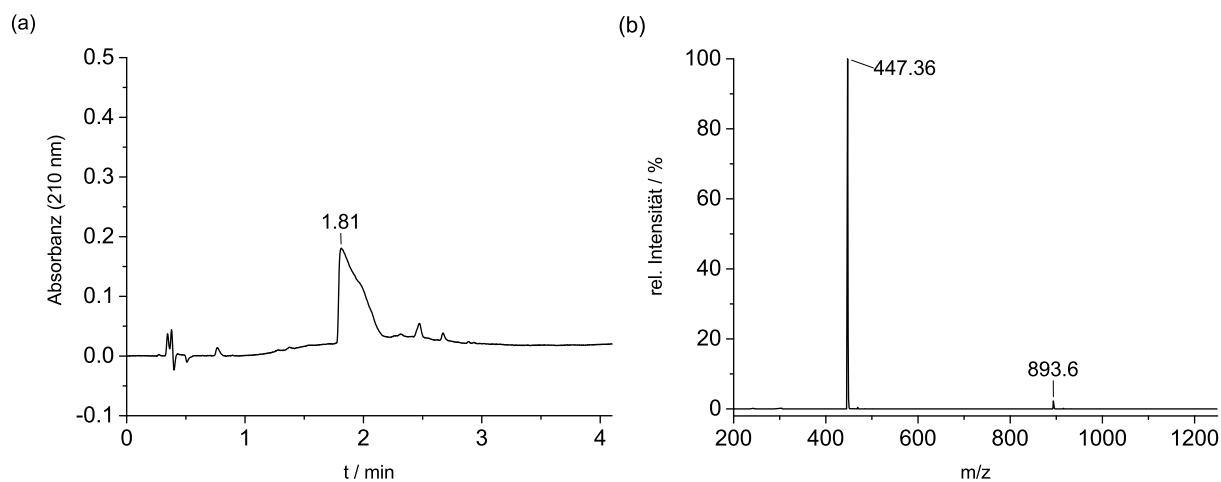


Abbildung 5.6. Charakterisierung von TREN-(suc-OH)₃, (a) UPLC (210 nm, 10 % B bis 90 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

TREN-(suc-OH)₃ [C₁₈H₃₀N₄O₉]: 446.45 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 1.81$ min (10 % B bis 90 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ ber. 447.46, gef. 447.36; $[2M+H]^+$ ber. 893.91 gef. 893.6.

Festphasensynthese von TREN-(suc-GPP-GPP-GSP-GPP-OH)₃ und TREN[suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-OH]₃

Die Peptidsynthese und Synthese des Schaltsegmentes wurde, wie zuvor beschrieben, durchgeführt (siehe allgemeine Peptidsynthese 5.3.6). Die Synthese von TREN-(suc-Peptid)₃ erfolgte nach der Vorschrift 5.3.5. Nach Waschen mit NMP und DCM wurden die Peptide, welche einen Schaltsegment enthalten mit einer Reaktionsmischung von 20 % TFE, 10 % AcOH, 5 % TES, 62.5 % DCM (45 min schütteln) vom Harz abgespalten, was eine Erhaltung der Boc-Schutzgruppe des Serins erlaubt. Peptide ohne das Schaltsegment wurden nach der Standardprozedur (beschrieben in Abschnitt allgemeine Peptidsynthese 5.3.1) abgespalten. Das Produkt wurde 1:2 (v/v) in 1,4-Dioxan verdünnt und unter reduziertem Druck aufkonzentriert. Anschließend wurden die Peptide in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert (20 min, 9000 rpm) und der Überstand wurde abdekantiert. Der Rückstand wurde in 1,4-Dioxan gelöst und erneut in kaltem Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Anschließend wurde der Feststoff in ACN/Wasser (1:2 v/v) gelöst und gefriergetrocknet. Desweiteren wurden die Peptide mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Charakterisierung von TREN-(suc-GPP-GPP-GSP-GPP-OH)₃

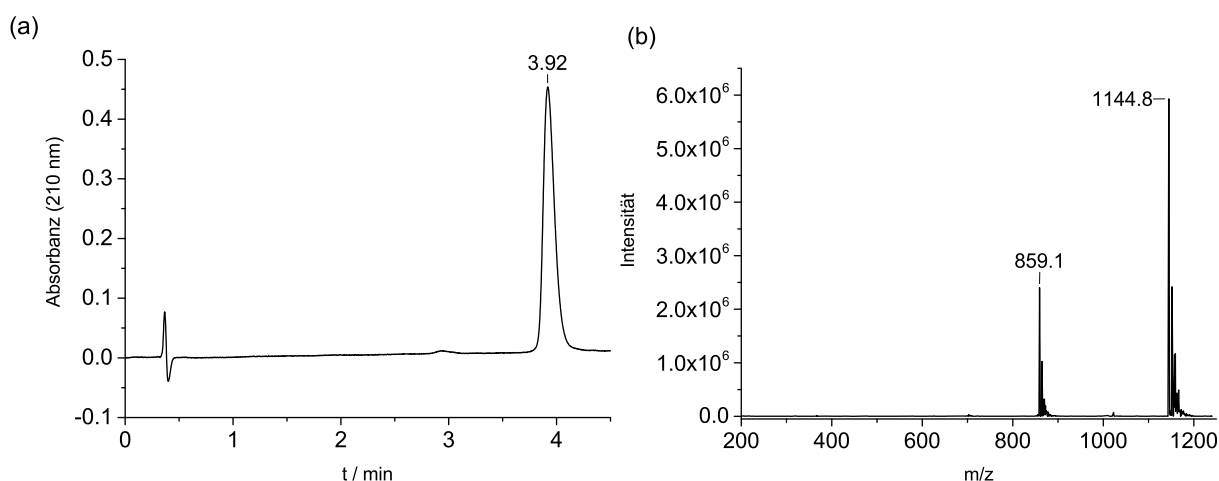


Abbildung 5.7. Charakterisierung von TREN-[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-OH]₃, (a) UPLC (210 nm, 15 % B bis 30 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

TREN-[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-OH]₃ [C₁₅₆H₂₂₈N₄₀O₄₈]: 3431.72 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 3.92$ min (15 % B bis 30 % B, 4 min.), ESI-MS (m/z): [M+3H]³⁺ ber. 1144.91, gef. 1144.8; [M+4H]⁴⁺ ber. 858.94, gef. 858.94. HPLC (210 nm): $t_R = 20.5$ min (15 %B bis 20 %B, 30 min).

Charakterisierung von TREN-(suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-OH)₃

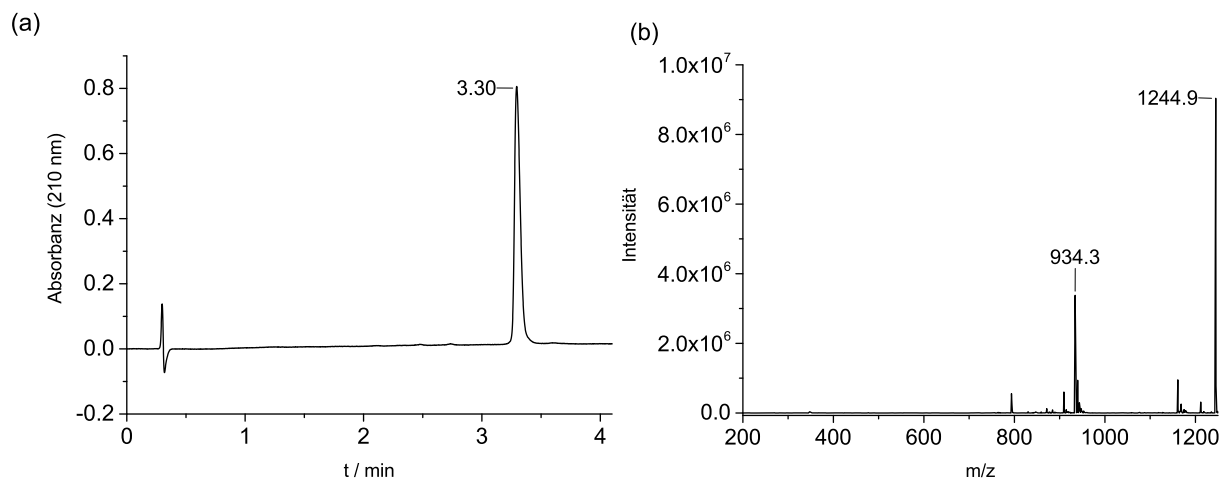


Abbildung 5.8. Charakterisierung von TREN-[suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-OH]₃, (a) UPLC (210 nm, 20 % B bis 40 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

TREN-[suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-OH]₃: 3431.72 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 3.30$ min (20 % B bis 40 % B, 4 min.), ESI-MS (m/z): [M+3H]³⁺ ber. 1245.03 gef. 1244.9; [M+4H]⁴⁺ ber. 934.03 gef. 934.3; HPLC (210 nm): $t_R = 18.3$ min. (20 % B bis 40 % B, 30 min).

Synthese von TREN-(suc-Pep-COSR')₃

Es wurden TREN-(suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR')₃ als auch TREN-(suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-COSR')₃ synthetisiert, der *p*-Acetamidothiophenolrest wird als -COSR' gekennzeichnet.

Die Reaktionsmischung, bestehend aus PyBOP/DIPEA/4-Acetamidothiophenol (9/9/9 Äq.) in DCM gelöst, wurde zu 1 Äq. des entsprechenden Edukts TREN-[suc-Pep]₃ hinzugegeben und für 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Argonstrom entfernt und das Produkt in ACN/Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Charakterisierung von TREN-(suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR')₃

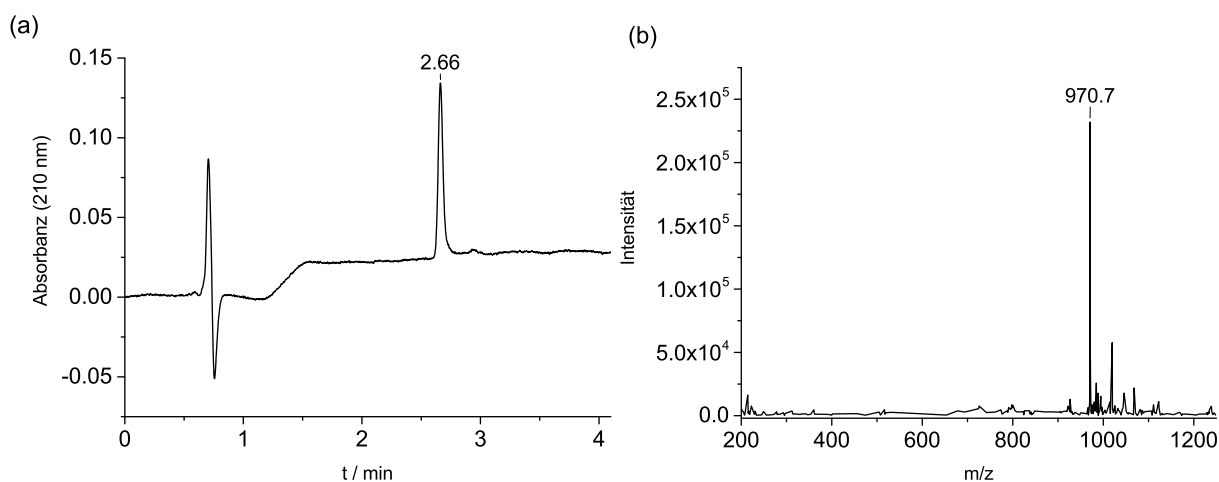


Abbildung 5.9. Charakterisierung von TREN-[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR']₃, (a) UPLC (210 nm, 20 % B bis 50 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

TREN-[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR']₃: 3879.36 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 2.66$ min (20 % B bis 50 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): $[M+4H]^{4+}$ ber. 970.85, gef. 970.7; HPLC (210 nm): $t_R = 16.4$ min (20 % B bis 50 % B, 30 min).

Charakterisierung von TREN-(suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-COSR')₃

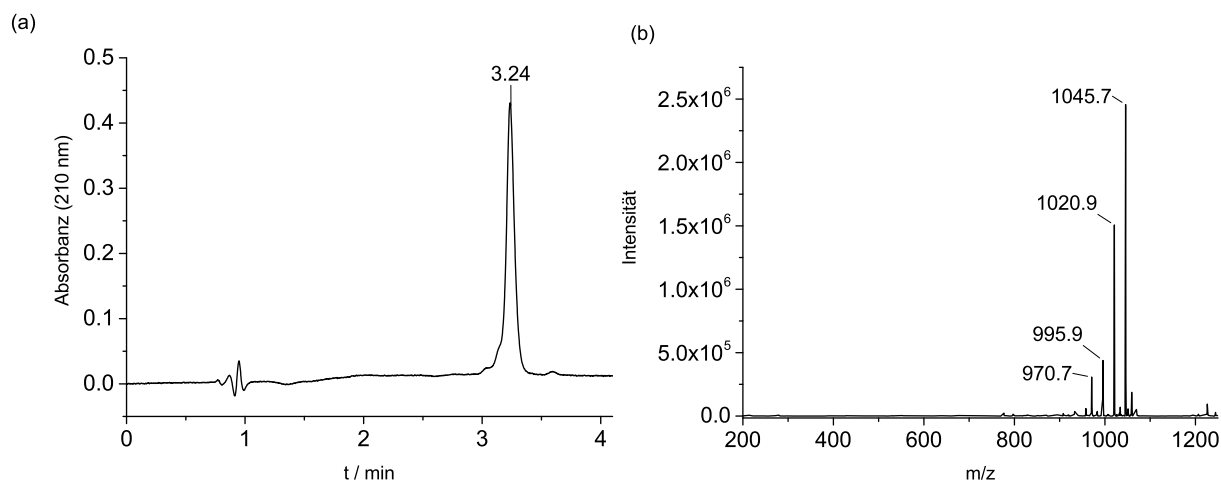


Abbildung 5.10. Charakterisierung von TREN-[suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-COSR']₃, (a) UPLC (210 nm, 40 % B bis 60 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

TREN-[suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-COSR']₃: 4179.7 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 3.24$ min (40 % B bis 60 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): $[M+4H]^{4+}$ ber. 1045.93 gef. 1045.7; TREN-[suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-COSR']₂[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR'] 4079.5 g/mol, $[M+4H]^{4+}$ ber. 1020.88 gef. 1020.9; TREN-[suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-COSR']₂[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR']₂ 3979.47 g/mol, $[M+4H]^{4+}$ ber. 995.88 gef. 1020.9; TREN-[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR']₃ 3879.36 g/mol, $[M+4H]^{4+}$ ber. 970.85 gef. 970.7; HPLC (210 nm): $t_R = 8.0$ min (30 % B bis 50 % B, 30 min).

5.4.3 Synthese von TREN-(suc-[GPP]_{1/3/7})₃

Die Peptidsynthese erfolgte nach dem Peptidsyntheseprotokoll 5.3.1 unter Verwendung eines 2-Chlortritylharzes. Die anschließende Kupplung von TREN-(suc-OH)₃ an die entsprechenden Peptide erfolgte nach Protokoll 5.3.5. Die Produkte TREN-(suc-[GPP]_{1/3/7})₃ wurden mit TFA nach Protokoll 5.3.2 vom Trägerharz abgespalten. Der qualitative Nachweis einer Produktbildung erfolgte mittels MALDI-TOF-MS. Für TREN-(suc-[GPP]₇)₃ konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden. Auf die Zuordnung aller Signale wurde verzichtet, da es sich lediglich um den qualitativen Nachweis der Produkte handelte.

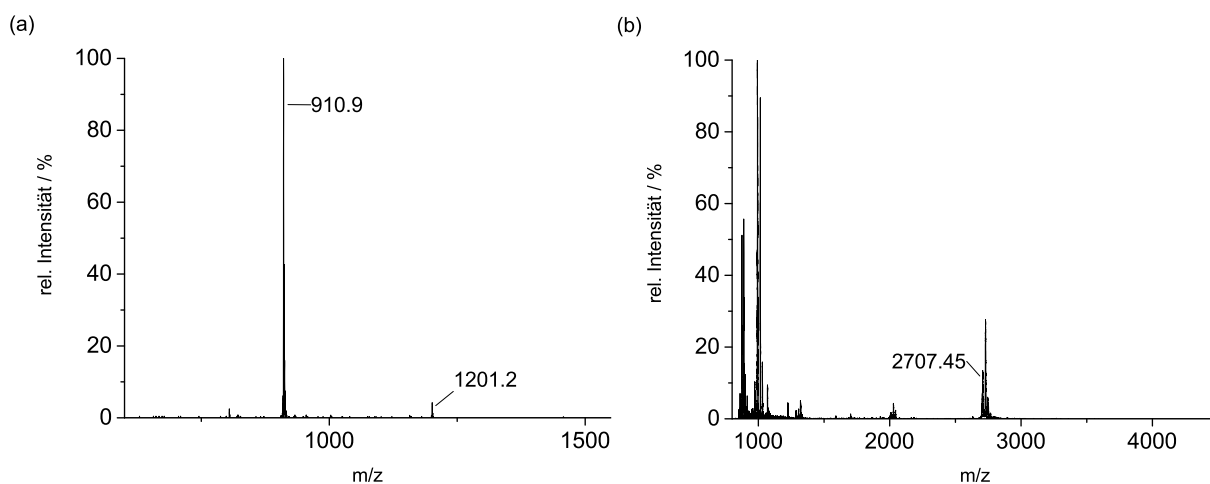


Abbildung 5.11. MALDI-TOF-MS Analyse von (a) TREN-(suc-[GPP])₃ und (b) TREN-(suc-[GPP]₃)₃.

TREN-(suc-[GPP])₃ [C₅₄H₈₁N₁₃O₁₈]: 1200.3 g/mol, ex. Masse 1199.58, MALDI-TOF-MS (*m/z*): gef. [M+H]⁺ 1201.2. Bei der Masse *m/z* = 910.9 handelt es sich vermutlich um ein Nebenprodukt einer Abbruchsequenz resultierend in TREN-(suc-GP)₃ mit der molaren Masse 908,95 g/mol.

TREN-(suc-[GPP]₃)₃ [C₁₂₆H₁₈₃N₃₁O₃₆]: 2707.99 g/mol, ex. Masse 2706.34, MALDI-TOF-MS (*m/z*): gef. [M+H]⁺ 2707.45, [M+Na]⁺ 2729.20, [M+K]⁺ 2745.47.

5.5 Peptide für die Templatstrategie

In diesem Abschnitt wird die Synthese einzelner Peptidsequenzen beschrieben, auf die verwendeten Syntheseprotokolle aus Sektion 5.3 wird entsprechend verwiesen.

5.5.1 Synthese von Cys-[Gly-Pro-Pro]₇

Das Peptid mit der Sequenz C[GPP]₇ wurde entsprechend des allgemeinen Peptidsynthese Protokolls synthetisiert (siehe Abschnitt 5.3.1): Als Synthescharz diente ein TentagelSRAM Harz, zudem wurde ein 0.24 mM Ansatz mit Einfachkupplung ohne Acetylierung verwendet.

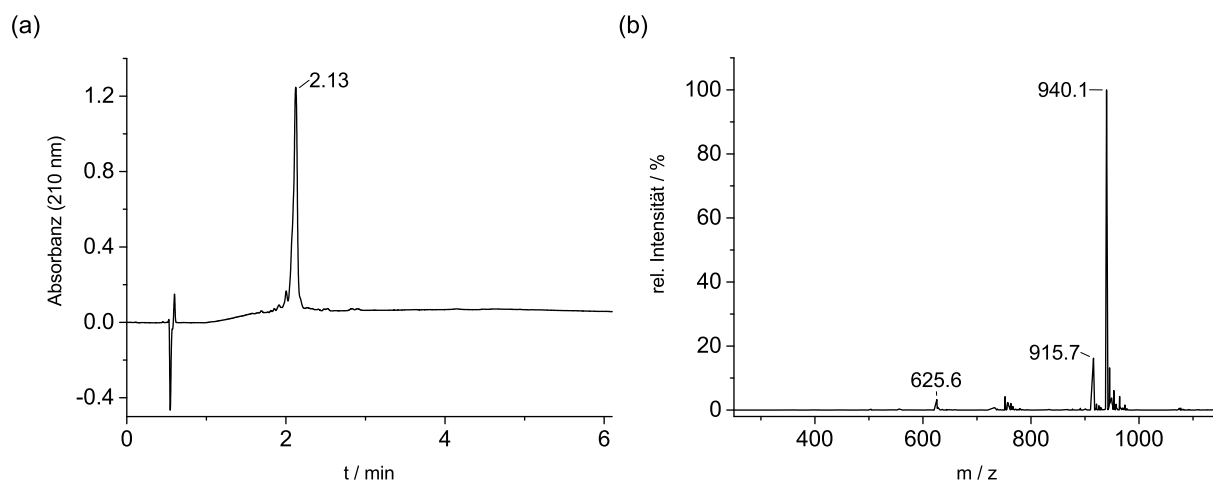


Abbildung 5.12. Charakterisierung von C[GPP]₇, (a) UPLC (210 nm, 10 % B bis 90 % B, 6 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

C[GPP]₇: 1879.15 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 2.13$ min (10 % B bis 90 % B, 6 min, BEH C18 Säule (110 Å, 1.7 µm, 100 x 2.1 mm)), ESI-MS (m/z): $[M+2H]^{2+}$ ber. 940.58 gef. 940.1.

5.5.2 Synthese von Cys-Pro-Pro-[Gly-Pro-Pro]₄

Das Peptid mit der Sequenz CPPGPPGPPGPPGPP wurde entsprechend des allgemeinen Peptidsynthese Protokolls synthetisiert (siehe Abschnitt 5.3.1): Es wurde ein 0.25 mM Ansatz mit Tentagel-SRAM-Harz verwendet. Bis zur 9. Aminosäure wurde eine Einzel- und nach der 9. Aminosäure eine Doppelkupplung verwendet. Nach jedem Kupplungsschritt wurde acetyliert. Abschließend erfolgte eine Semipräparative Aufreinigung des Peptides.

Charakterisierung von Cys-Pro-Pro-[Gly-Pro-Pro]₄

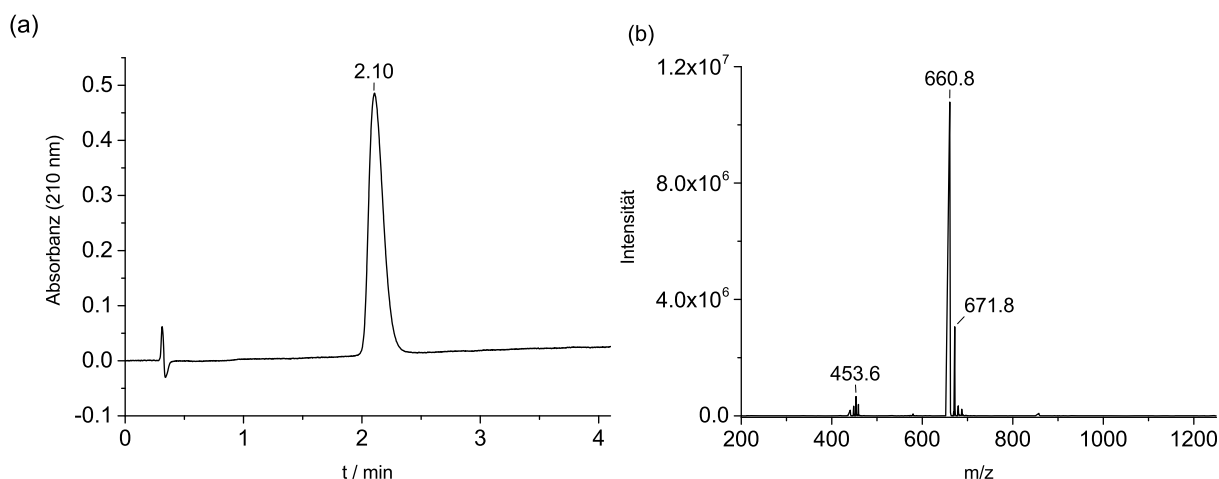


Abbildung 5.13. Charakterisierung von CPP-GPP-GPP-GPP-GPP, (a) UPLC (210 nm, 10 % B bis 30 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

CPP-GPP-GPP-GPP-GPP-NH₂: 1320.52 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 2.10$ min (10 % B bis 30 % B, 4 min.), ESI-MS (m/z): $[M+2H]^{2+}$ ber. 661.27 gef. 660.8, $[M+H+Na]^{2+}$ ber. 672.26 gef. 671.8, $[M+H+2Na]^{3+}$ ber. 455.84 gef. 453.6; HPLC (210 nm): $t_R = 11.0$ min (10 % B bis 30 % B, 30 min).

5.5.3 Synthese von $\text{CMP}^{(-T-S)}$

Das Peptid mit der Sequenz GPPGPPGSPGPPCPPGPPGPPGPPGPP ($\text{CMP}^{(-T-S)}$) wurde entsprechend des allgemeinen Peptidsynthese Protokolls synthetisiert (siehe Abschnitt 5.3.1): Es wurde ein 0.25 mM Ansatz verwendet. Bis zur 12. Aminosäure wurde eine einzel- und nach der 9. Aminosäure Doppelkupplung verwendet. Nach jedem Kupplungsschritt wurde acetyliert. Als feste Phase wurde das mit Prolin vorbeladene 2-Chlortriethylharz verwendet.

Charakterisierung von $\text{CMP}^{(-T-S)}$

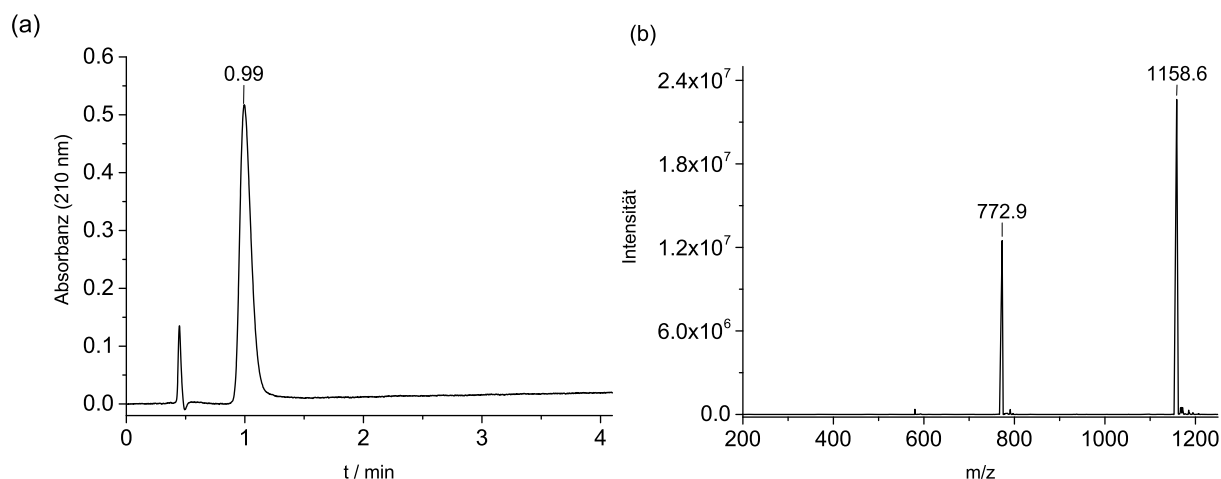


Abbildung 5.14. Charakterisierung von GPPGPPGSPGPPCPPGPPGPPGPPGPP, (a) UPLC (210 nm, 20 % B bis 40 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

GPPGPPGSPGPPCPPGPPGPPGPPGPP: 1320.52 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 2.10$ min (20 % B bis 40 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ber. 1158.81 gef. 1158.6, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 772.87 gef. 772.9; HPLC (210 nm): $t_R = 11.0$ min (10 % B bis 40 % B, 8.6 min, XBridge Säule, 60 °C).

5.5.4 Synthese von $\text{CMP}^{(-T+S)}$

Das Peptid mit der Sequenz $\text{GPPGPP-G(Boc)S-PGPPCPPGPPGPPGPPGPP}$ wurde entsprechend des allgemeinen Peptidsynthese Protokolls synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1): Es wurde ein 0.25 mM Ansatz verwendet. Bis zur 12. Aminosäure wurde eine Einzel- und nach der 9. Aminosäure Doppelkupplung verwendet und nach jedem Kupplungsschritt acetyliert. Als feste Phase wurde das mit Prolin vorbeladene 2-Chlortritylharz verwendet. Das Schaltsegment -Gly(Boc)Ser- wurde, wie in Sektion 5.3.6 beschrieben, synthetisiert und nach vollendeter Synthese im finalen Schritt nach der Vorschrift in 5.3.7 abgespalten, was in $\text{GPPGPP-G}(\psi)\text{S-PGPPCPPGPPGPPGPPGPP}$ ($\text{CMP}^{(-T+S)}$) resultierte.

Charakterisierung von $\text{GPPGPP-G(Boc)S-PGPPCPPGPPGPPGPPGPP}$

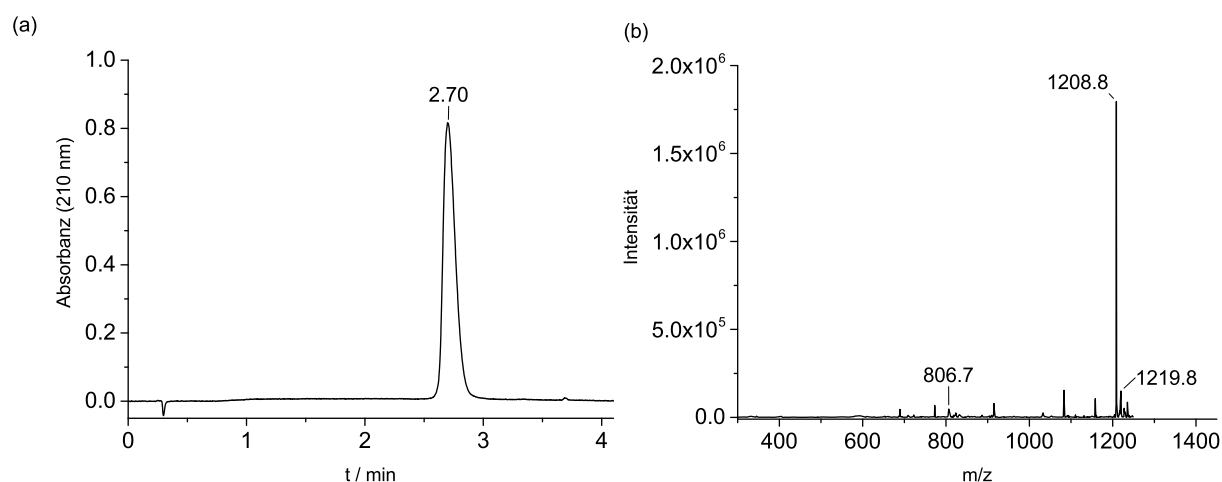


Abbildung 5.15. Charakterisierung von $\text{GPPGPP-G(Boc)S-PGPPCPPGPPGPPGPPGPP}$, (a) UPLC (210 nm, 30 % B bis 60 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

$\text{GPPGPP-G(Boc)S-PGPPCPPGPPGPPGPPGPP}$: 2415.72 g/mol, UPLC (210 nm):

$t_R = 2.70$ min (30 % B bis 60 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ber. 1208.87 gef. 1208.8, $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ ber. 1219.86 gef. 1219.8, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 806.25 gef. 806.7; HPLC (210 nm): $t_R = 6.5$ min (30 % B bis 60 % B, 22 min, XBridge Säule, 60 °C).

5.6 Synthese templatgebundener Peptide

5.6.1 Methode - Native chemische Ligation

Dieser Abschnitt beschreibt die allgemeine Durchführung der Nativen chemischen Ligation, Abweichungen von dieser Routine werden in den Abschnitten der einzelnen Ansätze beschrieben. Die einzelnen Reagenzien wurden in einem wässrigen Puffer der entsprechenden Konzentration gelöst und anschließend der pH-Wert kontrolliert. Dieser wurde gegebenenfalls mit verd. HCl und verd. NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Das Templat wurde separat in DMSO gelöst und anschließend zur Reaktionsmischung hinzugegeben. Der pH-Wert wurde erneut kontrolliert und gegebenenfalls eingestellt. Anschließend wurde mit Reinstwasser auf das entsprechende Ansatzvolumen eingestellt.

5.6.2 NCL von TG^{1st} und C[GPP]₇

NCL - Reaktionsbedingungen

Tabelle 5.2. Native chemische Ligation des TG^{1st} mit C[GPP]₇ bei verschiedenen Bedingungen.

	Na-Phosphatpuffer [mM]	pH	TG ^{1st} [Äq.]	C[GPP] ₇ [Äq.]	DTT [mM]	DMSO [%]	Gdn [M]	T [°C]
Lig1	100	7.4	1	3.5	3.5	10	/	RT
Lig2	100	7.4	1	3.5	20	10	3	60
Lig3	100	7.4	1	14	20	10	3	60

Die Ansätze wurden jeweils nach der Ligationmethode beschrieben in 5.6.1 durchgeführt. Die Ansatzgröße betrug jeweils 3 mL. Für den Ansatz **Lig1** erfolgte die Reaktionskontrolle nach 1 h und für die Ansätze **Lig2** und **Lig3** jeweils nach Reaktionsstart (0 min) und nach 30 min.

MALDI-TOF-MS Messungen des Ligationsansatzes Lig1

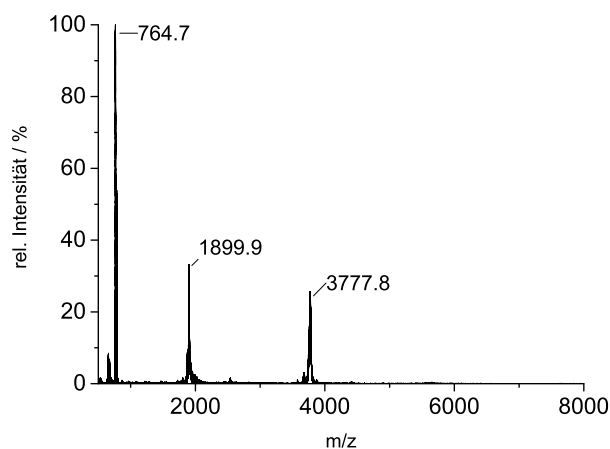


Abbildung 5.16. MALDI-TOF-MS Messung des Rohproduktes des Ligationsansatzes **Lig1** nach 1 h Reaktionszeit

MALDI-TOF-MS Analyse des Rohproduktes: TG^{1st} (**14**) $[\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_3]$ 765.02 g/mol: $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 766.03, gef. 764.7; $\text{H}_2\text{N}-\text{C}[\text{GPP}]_7-\text{NH}_2$ $[\text{C}_{87}\text{H}_{127}\text{N}_{23}\text{O}_{22}\text{S}]$ 1879.15 g/mol: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ber. 1902.14, gef. 1899.9; Dimerisation über Disulfidoxidation von $2 \times \text{H}_2\text{N}-\text{C}[\text{GPP}]_7-\text{NH}_2$ $[\text{C}_{174}\text{H}_{252}\text{N}_{46}\text{O}_{44}\text{S}_2]$ 3756.27 g/mol: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ber. 3779.26, gef. 3777.8; erwartetes Produkt $\text{TREN}-(\text{suc}-\text{C}[\text{GPP}]_7)_3$ $M_w = 6029.84$ g/mol.

MALDI-TOF-MS Messungen des Ligationsansatzes Lig2

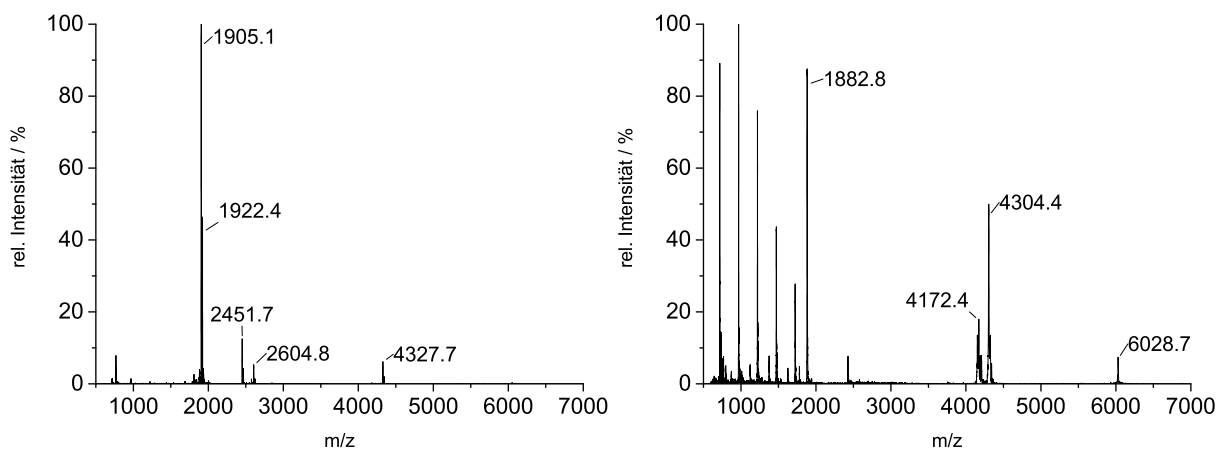


Abbildung 5.17. MALDI-TOF-MS Messungen des Rohproduktes des Ligationsansatzes **Lig2** nach Reaktionsstart (links) und 30 min (rechts).

MALDI-TOF-MS Analyse des Rohproduktes: Zuordnung des erwarteten Produktes TREN-[suc-C[GPP]₇]₃ $M_w = 6029.84$ g/mol: $[M+H]^+$ ber. 6030.8, gef. 6028.7.

Auf die Zuordnung aller Massensignale wurde verzichtet, da es sich bei diesen Experimenten um einen qualitativen Nachweis des Produktes TREN-(suc-C[GPP]₇)₃ handelte.

MALDI-TOF-MS Messungen des Ligationsansatzes Lig3

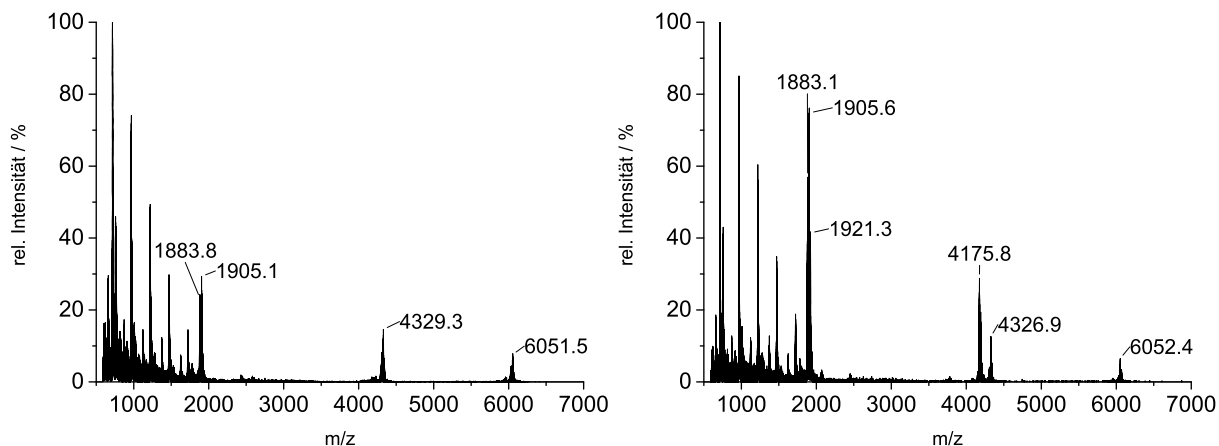


Abbildung 5.18. MALDI-TOF-MS Messungen des Rohproduktes des Ligationsansatzes **Lig3** nach Reaktionsstart (links) und 30 min (rechts).

MALDI-TOF-MS Analyse des Rohproduktes: Zuordnung des erwarteten Produktes TREN-(suc-C[GPP]₇)₃ $M_w = 6029.84$ g/mol: $[M+Na]^+$ ber. 6052.83, gef. 6051.5 nach Reaktionsstart und 6052.4 nach 30 min.

Auf die Zuordnung aller Massensignale wurde verzichtet, da es sich bei diesen Experimenten um einen qualitativen Nachweis des Produktes TREN-(suc-C[GPP]₇)₃ handelte.

NCL unter Zusatz von 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MesNa)

Der Ansatz wurde entsprechend der Ligationsmethode, beschrieben in 5.6.1, durchgeführt. Die Ansatzgröße war jeweils 1 mL unter Verwendung der in Tabelle 5.3 gelisteten Reagenzien. Als Puffer wurde ein Natriumphosphatpuffer verwendet. Die Reaktionskontrolle erfolgte nach 1 h, 2 h und 12 h. Die Entsalzung der Rohprodukte erfolgte über CHROMABOND® C18 ec Polypropylensäulen entsprechend des Standardprotokolls des Herstellers. Nach 12 h Reaktionszeit wurde die Probe zusätzlich mit einem Überschuss an TCEP für 30 min bei RT reduziert.

Tabelle 5.3. Native chemische Ligation des TG^{1st} mit C[GPP]₃ mit MesNa und DTT.

	Puffer [mM]	pH	TG1st [Åq.]	C[GPP] ₃ [Åq.]	MesNa [mM]	DTT [mM]	DMSO [%]	Gdn [M]	T [°C]
Lig4	100	7.4	1	3.5	20	100	10	3	60

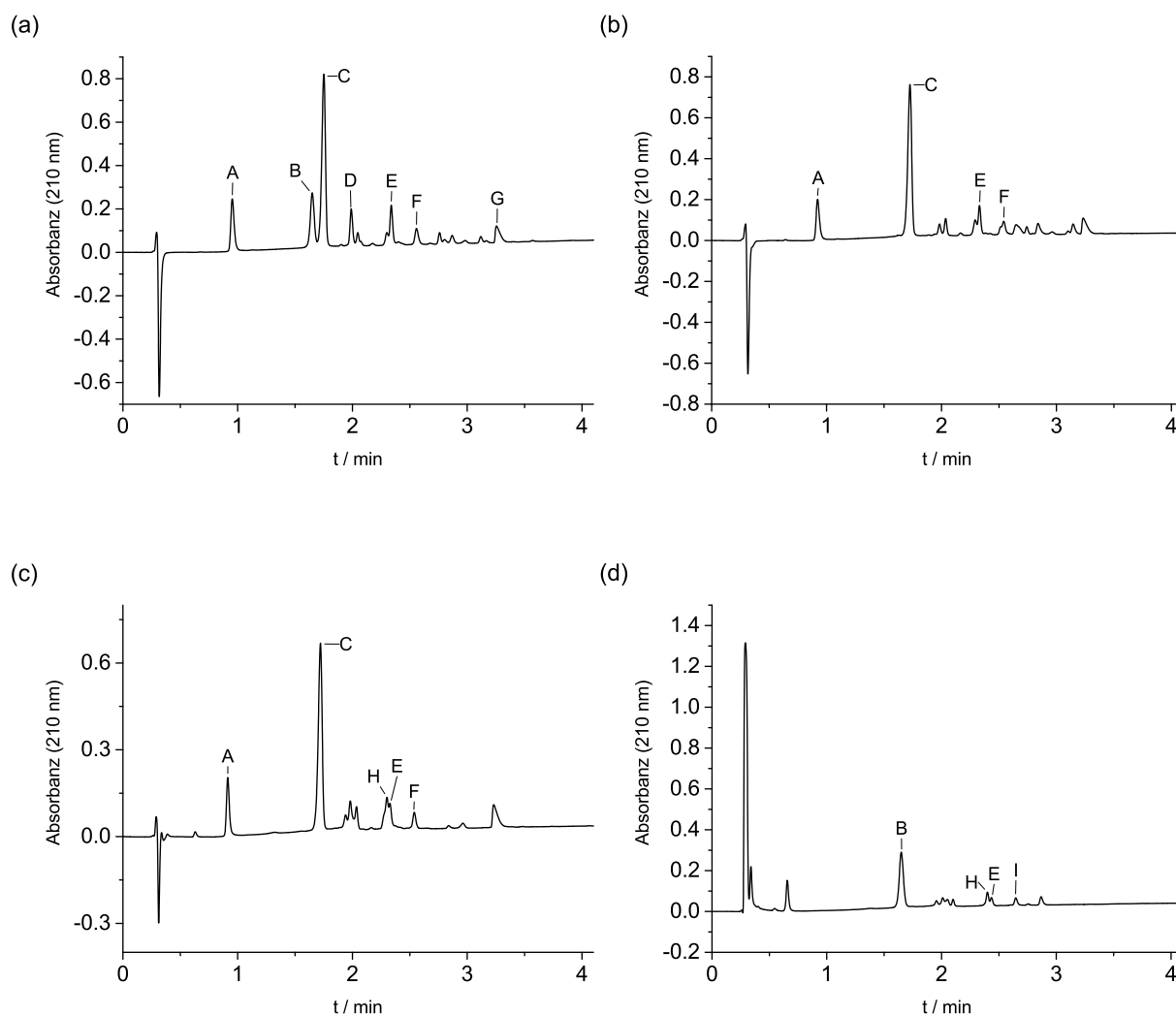


Abbildung 5.19. NCL Reaktionen von TG^{1st} und C[GPP]₃, Reaktionsbedingungen nach Tabelle 5.3.; UPLC (210 nm, 10 % B bis 40 % B, 4 min) nach Reaktionszeiten von (a) 1 h, (b) 2 h, (c) 12 h, (d) 12 h und Reduktion mit TCEP.

Tabelle 5.4. UPLC-MS Ergebnisse der nativen chemische Ligation des TG^{1st} mit C[GPP]₃ unter Zusatz von MesNa und DTT, sowie Postulierung möglicher Nebenprodukte.

#	Verbindung	M _w /g·mol ⁻¹	t _R /min	Molekül -Ion	berechnet	gefunden
A	MesNa Dimer	281.38	0.95	[M+H] ⁺	282.38	281.30
B	C[GPP] ₃	874.02	1.65	[M+H] ⁺	875.03	874.60
				[M+2H] ²⁺	438.02	437.90
C	Disulfid von	1013.19	1.75	[M+H] ⁺	1014.20	1014.44
	C[GPP] ₃ /MesNa			[M+2H] ²⁺	508.11	507.99
D	C[GPP] ₃ Dimer	1746.02	1.99	[M+2H] ²⁺	874.02	873.90
				[M+3H] ³⁺	583.01	583.05
E	T + 2P + cycl.	2140.44	2.38	[M+2H] ²⁺	1071.23	1070.05
				[M+3H] ³⁺	714.49	713.77
F	T + 3P + MesNa	3154.64	2.56	[M+3H] ³⁺	1052.22	1051.62
				[M+4H] ⁴⁺	789.44	789.23
G	unbekannte Spezies		3.26			279.18
H	T + 2P - TE	2158.46	2.30	[M+2H] ²⁺	1080.24	1078.92
				[M+3H] ³⁺	720.49	719.79
I	T+3P	3014.46	2.65	[M+3H] ³⁺	1005.83	1005.69
				[M+4H] ⁴⁺	754.62	754.54

Legende: „T + 1P“ und „T + 2P“: Ligation von einem bzw. zwei Peptiden an ein Templat.

Bei „cycl.“ handelt es sich um das cyclische intramolekulare Nebenprodukt.

Bei „- TE“ handelt es sich um einen hydrolysierten Thioester.

Native chemische Ligation - unter thiofreien Bedingungen

Der Ansatz wurde entsprechend der Ligationmethode, beschrieben in 5.6.1 durchgeführt. Die Ansatzgröße war 1 mL, unter Verwendung der in Tabelle 5.5 gelisteten Reagenzien. Als Puffer wurde ein Natriumphosphatpuffer verwendet. Die Reaktionskontrolle erfolgte nach 12 h. Die Entsalzung der Rohprodukte erfolgte über CHROMABOND® C18 ec Polypropylensäulen entsprechend des Standardprotokolls des Herstellers.

Tabelle 5.5. Native chemische Ligation des TG^{1st} mit C[GPP]₃, ohne Thioladditive.

	Puffer [mM]	pH	TG1st [Äq.]	C[GPP]3 [Äq.]	TCEP [mM]	Na-Ascorbat [mM]	DMSO [%]	Gdn [M]	T [°C]
Lig5	100	7.4	1	3.5	50	100	10	3	37

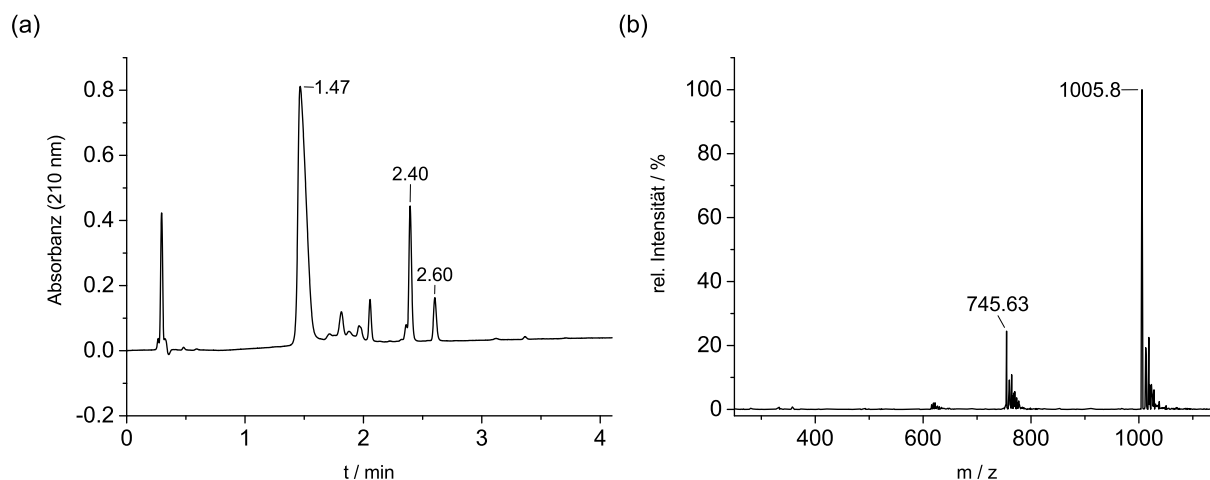


Abbildung 5.20. NCL Reaktionen von TG^{1st} und C[GPP]₃, Reaktionsbedingungen nach Tabelle 5.5. (a) UPLC (210 nm, 10 % B bis 40 % B, 4 min) nach 12 h Reaktionszeit, (b) ESI-MS des Produktpeaks $t_R = 2.60$ min.

UPLC (210 nm): (10 % B bis 40 % B, 4 min)

$t_R = 1.47$ min: C[GPP]₃: 874.02 g/mol, ESI-MS (m/z): ber. $[M+H]^+$ 875.03, $[M+2H]^{2+}$ 438.02; gef. 874.55 und 438.01.

$t_R = 2.40$ min: TG^{1st}+2×C[GPP]₃ + Ring: 2140.44 g/mol, ESI-MS (m/z): ber. $[M+2H]^+$ 1071.23; $[M+3H]^{3+}$ 714.49; gef. 714.51 und 1071.07.

$t_R = 2.60$ min: TREN-(suc-C[GPP]₃)₃: 3014.46 g/mol, ESI-MS (m/z): ber. [M+3H]³⁺ 1005.83; [M+4H]⁴⁺ 754.62; gef. 754.66 und 1005.76.

mögliche Nebenprodukte:

$t_R = 1.81$ min: TG^{1st} + 1 × C[GPP]₃ und Hydrolyse der restlichen Thioester: M_w 1302.46 g/mol: ber. [M+3K]³⁺ 473.25, gef. 473.98.

$t_R = 2.05$ min: TG^{1st} + 2 × C[GPP]₃ + TCEP: M_w 2514.83; ber. [M+2H+4Na]⁶⁺ 434.80, [M+3H+Na]⁴⁺ 635.21; gef. 634.17 und 435.89.

5.6.3 Vergleich der NCL von TG^{1st} und TG^{2nd} mit CPP[GPP]₄

Die Ansätze wurden entsprechend der Ligationsmethode, beschrieben in 5.6.1, durchgeführt. Die Ansatzgröße war jeweils 1 mL, unter Verwendung der Reaktionsbindungen **Lig6** (siehe Tabelle 5.6). Als Puffer wurde ein Natriumphosphatpuffer verwendet. Die Reaktionskontrollen erfolgten nach Reaktionsstart (0 min), 30 min, 1 h und 2 h. Bei dem Templat der ersten Generation (TG^{1st}) handelt es sich um TREN-(suc-SBzl)₃ (**14**) und bei dem Templat der zweiten Generation (TG^{2nd}) um TREN-[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR']₃ (-COSR' = Ester des *p*-Acetamidothiophenols). Als Cysteinylpeptid wurde CysProPro[GlyProPro]₄-NH₂ verwendet.

Tabelle 5.6. Native chemische Ligation der TG^{1st} und TG^{2nd} mit CPP[GPP]₄, ohne Thioladditive.

	Puffer [mM]	pH	Templat [Äq.]	Peptid [Äq.]	TCEP [mM]	Na-Asc [mM]	DMSO [%]	Gdn [M]	T [°C]
Lig6	100	7.4	1	10	50	100	10	6	RT

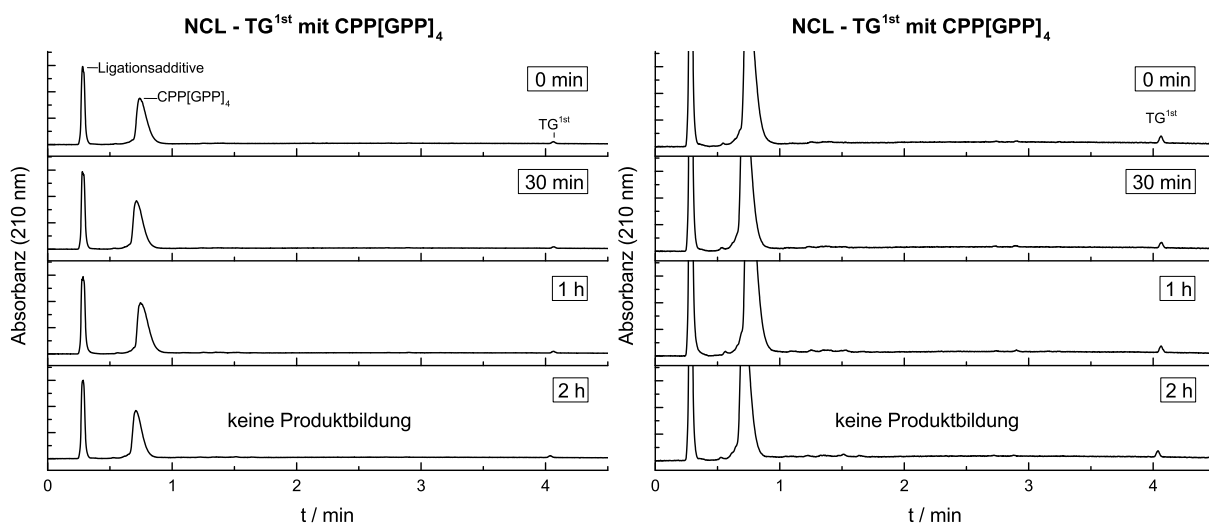


Abbildung 5.21. UPLC-MS Messungen der Ligation von TG^{1st} mit dem Peptid CPP[GPP]₄ nach Reaktionsstart (0 min), 30 min, 1 h und 2 h. Die Reaktionsbedingungen können der Tabelle 5.6 entnommen werden. UPLC: 210 nm (20 % B bis 70 % B, 4 min, 60 °C). (Vollständige Chromatogramme (links), einheitlich vergrößert (rechts))

Tabelle 5.7. ESI-MS Ergebnisse der Ligation von TG^{1st} mit CPP[GPP]₄

Verbindung	M _w / g·mol ⁻¹	t _R / min	Molekül -Ion	berechnet	gefunden
CPP[GPP] ₄	1320.52	0.71	[M+2H] ²⁺	661.21	660.8
Templat (TG ^{1st})	765.02	4.07	[M+H] ⁺	766.03	765.5

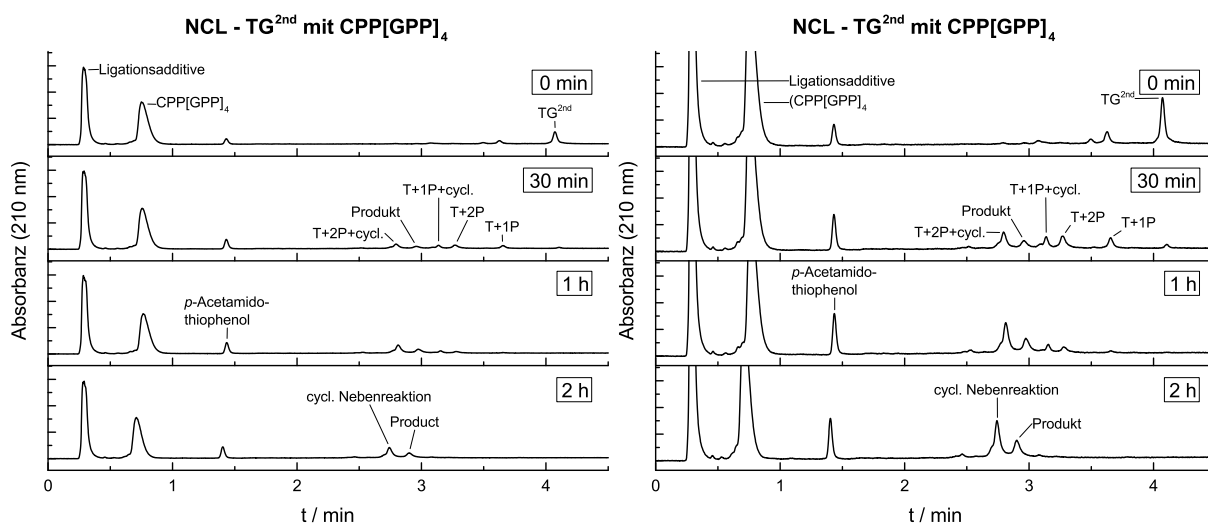


Abbildung 5.22. UPLC-MS Messungen der Ligationen von TG^{2nd} mit dem Peptid CPP[GPP]₄ nach Reaktionsstart (0 min), 30 min, 1 h und 2 h. Die Reaktionsbedingungen können der Tabelle 5.6 entnommen werden. UPLC: 210 nm, 20 % B bis 40 % B, 4 min, 60 °C (T+2P = TG^{2nd} Ligation mit zwei Peptiden, cycl. = cyclisches Nebenprodukt). (Vollständige Chromatogramme (links), einheitlich vergrößert (rechts))

Tabelle 5.8. UPLC-MS Ergebnisse der Ligation von TG^{2nd} mit CPP[GPP]₄

Verbindung	M _w / g·mol ⁻¹	t _R / min	Molekül	berechnet	gefunden
-Ion					
CPP[GPP] ₄	1320.52	0.75	[M+2H] ²⁺	661.21	660.8
Acetamidothiophenol	167.23	1.43	[M+H] ⁺	168.23	168.2
Templat (TG ^{2nd})	3879.36	4.07	[M+4H] ⁴⁺	970.85	971.0
T + 1P	5032.66	3.63	[M+5H] ⁵⁺	1007.34	1007.5
T + 1P + cycl.	4865.43	3.14	[M+4H] ⁴⁺	1217.36	1217.0
T + 2P	6183.96	3.27	[M+5H] ⁵⁺	1237.80	1223.8
T + 2P + cycl.	6016.74	2.75	[M+5H] ⁵⁺	1204.35	1204.4
Produkt (T + 3P)	7336.26	2.90	[M+7H] ⁷⁺	1049.05	1048.9
			[M+6H] ⁶⁺	1223.72	1223.5

Legende: „T+1P“ und „T+2P“ Ligation von einem bzw. zwei Peptiden an ein Templat.

Bei „cycl.“ handelt es sich um das cyclische intramolekulare Nebenprodukt.

5.6.4 NCL von TG^{2nd} und CPP[GPP]₄ (CMP^(+T-S) und CMP^(+T+S))

Synthese von:

- TREN-(suc-GPP-GPP-GSP-GPP-CPP-GPP-GPP-GPP-GPP)₃; CMP^(+T-S) (**24**)
- TREN-(suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-CPP-GPP-GPP-GPP-GPP)₃; (**22b**)

Die Synthese der Vorstufen TREN-(suc-GPP-GPP-GSP-GPP-COSR')₃ als auch TREN-(suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-COSR')₃ wurde in Abschnitt 5.4.2 beschrieben. Die Native Chemische Ligation von TREN-(suc-Pep-COSR')₃ und dem cysteinhaltigen Peptid CPP[GPP]₄ wurde unter folgenden Pufferbedingungen durchgeführt: H₂PO₄ 200 mM, TCEP 50 mM, Gdn·HCl 6 M, Na-Ascorbat 200 mM, CysProPro[Gly-Pro-Pro]₄ 10 Äq., and 10 % DMSO. Der pH Wert wurde vor der Zugabe von TREN-(suc-Pep-COSR')₃ (1 Äq.) mit verd. NaOH auf 7.8 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde nach vollständiger Zugabe für 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die finale Boc-Entschützung von (**22b**), zur Synthese von (**23**), wird in Abschnitt 5.3.7 beschrieben.

Charakterisierung des Ligationsproduktes

TREN-(suc-GPP-GPP-GSP-GPP-CPP-GPP-GPP-GPP-GPP)₃

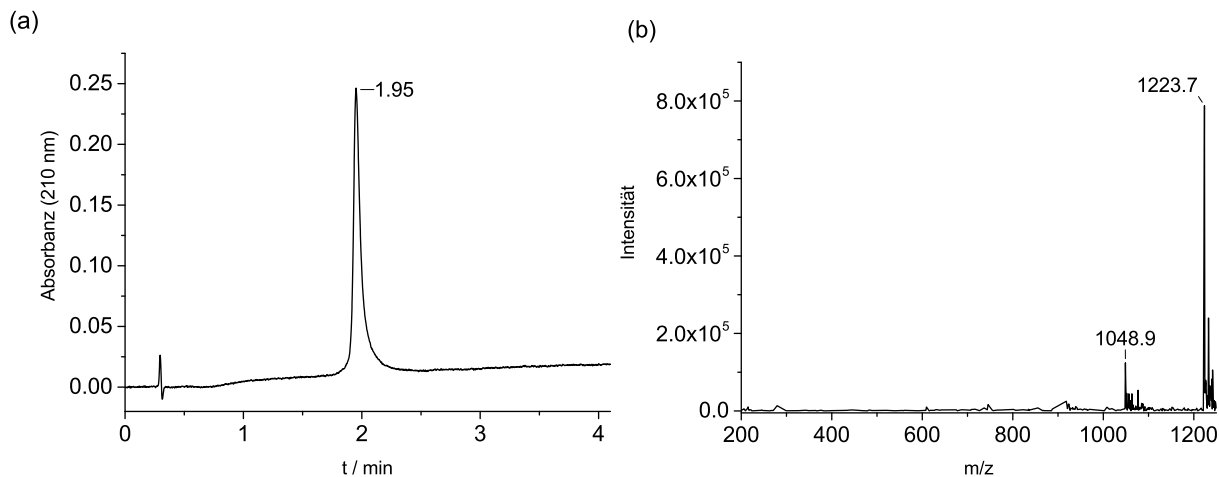


Abbildung 5.23. Charakterisierung von TREN-[suc-GPP-GPP-GSP-GPP-CPP-GPP-GPP-GPP-GPP]₃. (a) UPLC (210 nm, 20 % B bis 40 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

TREN-(suc-GPP-GPP-GSP-GPP-CPP-GPP-GPP-GPP-GPP)₃: 7336.26 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 1.95$ min (20 % B bis 40 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): $[M+6H]^{6+}$ ber. 1223.72 gef. 1223.7, $[M+7H]^{7+}$ ber. 1049.05 gef. 1048.9; HPLC (210 nm): $t_R = 4.6$ min (20 % B bis 40 % B, 22 min, XBridge Säule, 60 °C).

Charakterisierung des Ligationsproduktes

TREN-(suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-CPP-GPP-GPP-GPP-GPP)₃

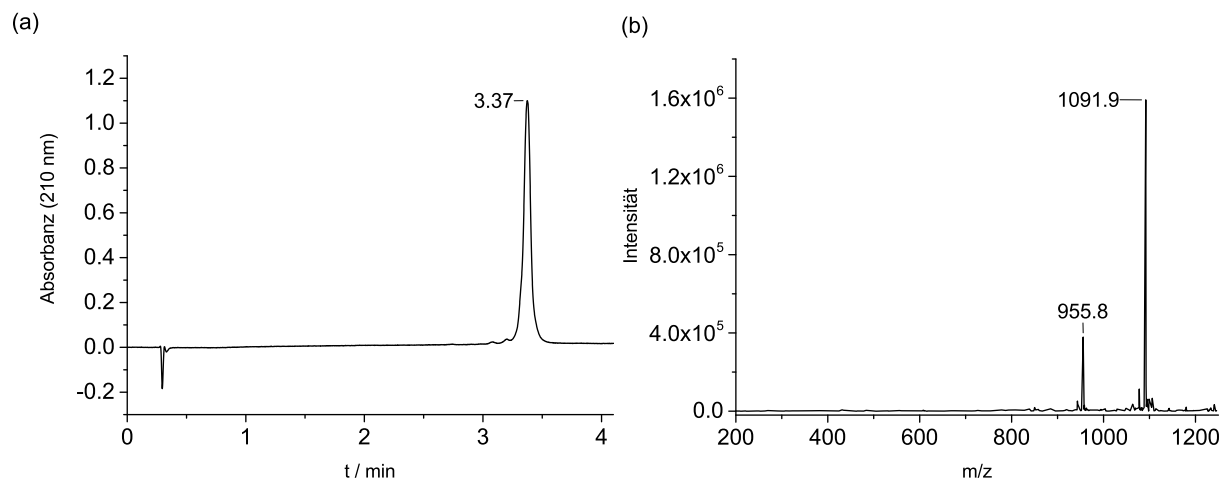


Abbildung 5.24. Charakterisierung von TREN-[suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-CPP-GPP-GPP-GPP-GPP]₃. (a) UPLC (210 nm, 20 % B bis 40 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

TREN-(suc-GPP-GPP-G(Boc)SP-GPP-CPP-GPP-GPP-GPP-GPP)₃: 7636.61 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 3.37$ min (20 % B bis 40 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): $[M+7H]^{7+}$ ber. 1091.95 gef. 1091.9, $[M+8H]^{8+}$ ber. 955.58 gef. 955.8; HPLC (210 nm): $t_R = 10.8$ min. (20 % B bis 40 % B, 22 min, XBridge Säule, 60 °C).

5.7 CD-Messungen templatgebundener Peptide

Die templatgebundenen Peptide und entsprechenden Kontrollen wurden bei einer Konzentration von 10 mg/mL für 2 Tage in einem Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, pH 7.2) equilibriert. Für die Messungen wurden die Proben auf 0.2 mg/mL verdünnt und für weitere 5 Tage bei dieser Konzentration equilibriert. Schmelzkurven wurden nach 5 Tagen Equilibrierung bei 0.2 mg/mL mit einem Temperaturanstieg von 1 °C/min bei 227 nm aufgenommen.

pH-abhängige CD-Messungen templatgebundener Peptide

Die Peptide wurden über Nacht in einem 0.1 M Zitronensäure Monohydrat/Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 5 und einer Peptidkonzentration von 10 mg/mL equilibriert. Vor den Messungen wurden die Proben auf eine Konzentration von 0.2 mg/mL unter Verwendung der entsprechenden Puffer (pH 5 oder pH 7) verdünnt.

5.8 Oxidation und Equilibrierung von wc2-Peptiden

5.8.1 Oxidation der wc2-Peptide: Pep^{GPP} , Pep^{GSP} , $\text{Pep}^{\psi N}$, $\text{Pep}^{\psi C/N}$, $\text{Pep}^{\psi C}$

Die entsprechenden wc2-Peptide (Pep^{GPP} , Pep^{GSP} , $\text{Pep}^{\psi N}$, $\text{Pep}^{\psi C/N}$, $\text{Pep}^{\psi C}$) wurden mit einer Konzentration von 50 mM, unter denaturierenden Bedingungen in einer Lösung von 6 M Gdn-HCl und 1 % H_2O_2 , welche zuvor mit verd. HCl auf pH 5 titriert wurde, oxidiert. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT geschüttelt.

5.8.2 Equilibrierung der wc2-Peptide: Pep^{GPP} , Pep^{GSP} , $\text{Pep}^{\psi N}$, $\text{Pep}^{\psi C/N}$, $\text{Pep}^{\psi C}$

Nach abgeschlossener Oxidation bei pH 5, wurden die Peptide auf 10 mg/mL verdünnt und über Nacht gegen einen Zitronensäure Monohydrat (0.1 M) / Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (0.2 M) -Puffer dialysiert. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7.4 erfolgte durch die erneute Dialyse gegen einen Kaliumphosphatpuffer (0.1 M) für mindestens 6 h.

5.8.3 CD-Messungen der wc2-Peptide: Pep^{GPP} , Pep^{GSP} , $\text{Pep}^{\psi N}$, $\text{Pep}^{\psi C/N}$, $\text{Pep}^{\psi C}$

Oxidation und Equilibrierung der wc2-Peptide (Pep^{GPP} , Pep^{GSP} , $\text{Pep}^{\psi N}$, $\text{Pep}^{\psi C/N}$, $\text{Pep}^{\psi C}$) erfolgte wie in den Abschnitten 5.8.1 und 5.8.2 beschrieben. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7.4 wurden die Peptide zusätzlich für 12 h (4 °C, pH 7.4) equilibriert, vor der CD-Messung auf 0.2 mg/ml verdünnt und unter diesen Bedingungen für weitere 5 Tage equilibriert. Schmelzkurven wurden nach 5 Tagen Equilibrierung bei 0.2 mg/mL mit einem Temperaturanstieg von 0.5 °C/min bei 227 nm aufgenommen.

pH abhängige CD-Messungen der wc2-Peptide: Pep^{GSP} und $\text{Pep}^{\psi C}$

Die Peptide Pep^{GSP} und $\text{Pep}^{\psi C}$ wurden wie in Abschnitt 5.8.1 oxidiert und anschließend mit einer Konzentration von 10 mg/mL gegen einen Puffer (Zitronensäuremonohydrat/ Na_2HPO_4 Puffer, 100 mM, pH 5) für mindestens 6 h dialysiert. Anschließend wurden die Peptide zusätzlich

bei pH 5 equilibriert. Vor den CD Messungen wurden die Peptide jeweils mit einem Puffer aus Zitronensäuremonohydrat/ Na_2HPO_4 , 100 mM, pH 7.4, auf eine Konzentration von 0.3 mg/mL verdünnt. Die Peptide wurden unter diesen Bedingungen bei 4 °C gelagert und die CD Messung nach 2 h und 4 h wiederholt.

5.8.4 Oxidations/Reduktion der wc2-Peptide: wc2-[GPP]_{3/7/50}

Um eine Oxidation der Proben von wc2-[GPP]_{3/7/50} (Peptidkonzentration 10 mg/mL) zu garantieren, wurden diese mit 0.1 % (v/v) H_2O_2 behandelt (pH 7.4, 0.1 M PBS Puffer), was die vollständige Cys-Cys-Verknüpfung sicherstellte. Für die reduzierten Proben wurde eine 1 M Lösung TCEP (Tris(2-carboxyethyl)-phosphin) in PBS hinzugegeben, was in einer finalen TCEP Konzentration von 0.1 mM resultierte.

Das Peptid wc2-[GPP]₅₀ war unter naturierenden Bedingungen nicht löslich und musste in Ameisensäure oder 6 M Guanidiniumthiocyanat gelöst werden. Für Messungen die eine Lösung dieses Peptids voraussetzten wurde dieses gegen PBS mit 4 M Gdn·HCl dialysiert.

5.8.5 CD-Messungen der wc2-Peptide: wc2-[GPP]_{3/7/50}

Oxidation bzw. Reduktion und Equilibrierung der wc2-[GPP]_{3/7/50} erfolgte nach Protokoll-2 aus Abschnitt 5.8.4. Die Messungen der kurzen wc2-[GPP]_{3/7} Peptide erfolgte bei 4 °C und die CD Messungen von wc2-[GPP]₅₀ wurden bei 20 °C durchgeführt. Es wurde jeweils eine Peptidkonzentration von 0.3 mg/mL eingesetzt. Die Messungen wurden an einem temperaturkontrollierten Jasco J-815 Spektrometer in 1 mm Quarzküvetten durchgeführt.

5.9 Oxidationskontrollexperimente unter Verwendung von Pep^{GSP}

Pep^{GSP} (SWCGTTPGSWCGT[GPP]₆GSP) wurde, wie in Abschnitt 5.8.1 beschrieben, oxidiert. Kleine Portionen der Reaktionsmischung wurden nach 6 min, 30 min, 4 h und 24 h für UPLC-MS Messungen entnommen. Die Messungen sind in Abbildung 5.25 dargestellt.

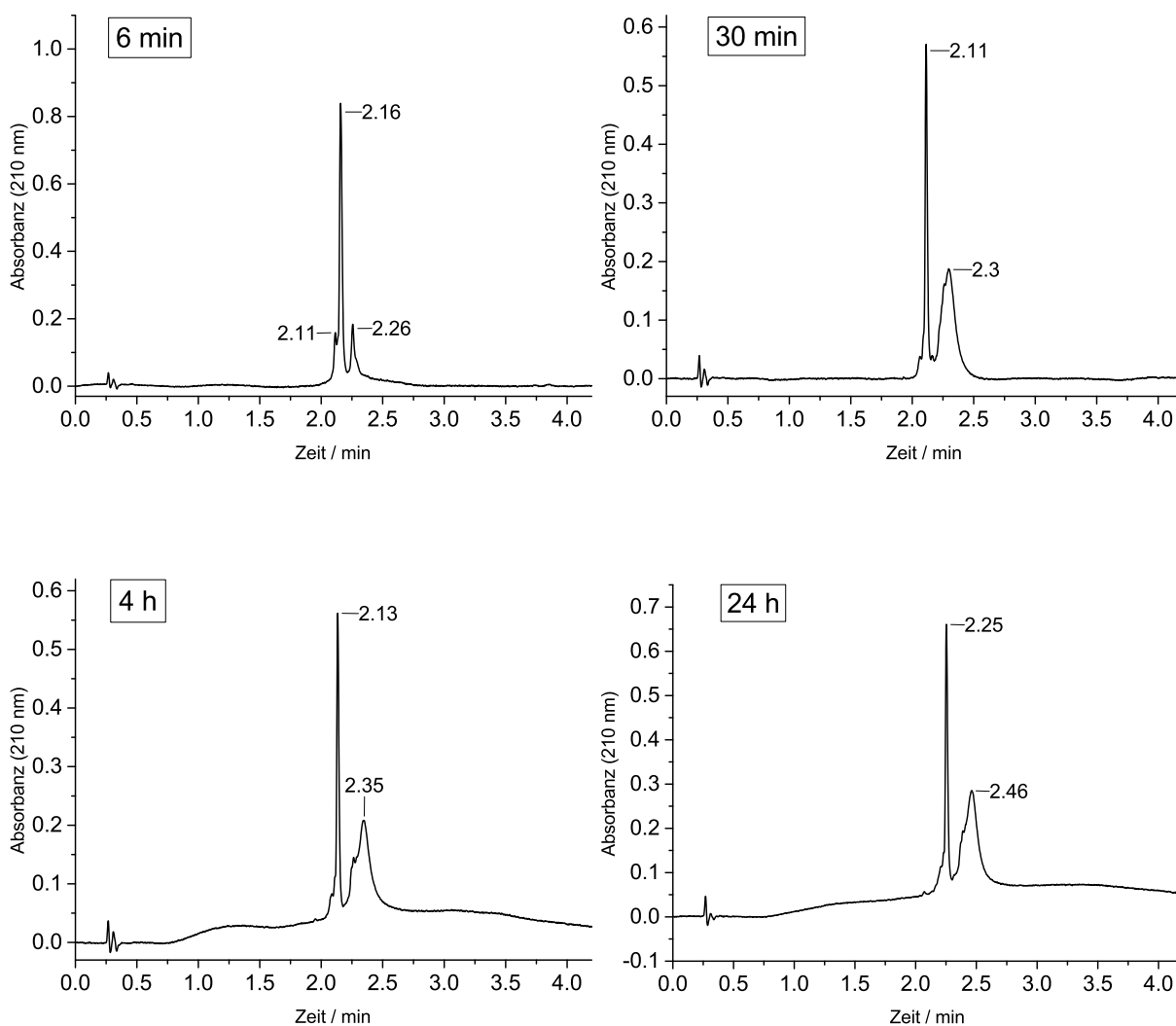


Abbildung 5.25. UPLC-MS-Messungen oxidiertes Pep^{GSP} nach 6 min, 30 min, 4 h und 24 h, es wurde jeweils eine kleine Menge des Rohproduktes injiziert. (UPLC-Konditionen: 210 nm, 10 % B bis 70 % B, 4 min, 60 °C)

ESI-MS Messungen der Oxidationskontrollexperimente unter Verwendung von Pep^{GSP}

berechnet:

Monomer 3091.4 g/mol: [M+3H]³⁺ 1031.47; [M+4H]⁴⁺ 773.86

Oxidiertes Monomer 3089.4 g/mol: [M+3H]³⁺ 1030.80, [M+4H]⁴⁺ 773.36

Dimer 6180.78 g/mol: [M+5H]⁵⁺ 1237,16; [M+6H]⁶⁺ 1031.14

Trimer 9270.14 g/mol: [M+9H]⁹⁺ 1031.02

gefunden:

6 min: UPLC (210 nm):

tR = 2.11 min; ESI-MS (*m/z*): 1030.83; 773.33

tR = 2.16 min; ESI-MS (*m/z*): 1031.49; 774.03

tR = 2.26 min; ESI-MS (*m/z*): 1237.17; 1031.09

30 min: UPLC (210 nm):

tR = 2.11 min; ESI-MS (*m/z*): 1030.87; 773.39

tR = 2.30 min; ESI-MS (*m/z*): 1237.28

4 h: UPLC (210 nm):

tR = 2.13 min; ESI-MS (*m/z*): 1031; 773.58

tR = 2.30 min; ESI-MS (*m/z*): 1236.99

24 h: UPLC (210 nm):

tR = 2.25 min; ESI-MS (*m/z*): 1030.84; 773.6

tR = 2.46 min; ESI-MS (*m/z*): 1237.01

5.10 Kontrolle der Integrität des DEPSI Segments in wc2-Schaltpeptiden

UPLC-Messungen

UPLC-MS Messungen von $\text{Pep}^{\psi C/N}$, $\text{Pep}^{\psi C}$, $\text{Pep}^{\psi N}$, Pep^{GPP} und Pep^{GSP} bestätigten die Integrität der Schaltsegmente unter leicht sauren Bedingungen ($\text{pH} < 5.5$). Alle Peptide wurden separat in ACN/Wasser 1:10 (v/v) mit 0.1 % HCOOH gelöst und vor der Messung mit TCEP reduziert. Alle Proben wurden anschließend mit Phosphatpuffer auf einen pH-Wert von 7.5 gebracht und unmittelbar erneut gemessen (siehe Abbildung 5.26).

(a) **Pep** $^{\psi N}$: 3101.4 g/mol, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 1034.81

$t_R = 2.21$ min, ESI-MS (m/z): gef. 1034.52, Verschiebung zu $t_R = 2.41$ min nach Schaltung (pH 7.5); Peakfläche des gebildeten Produktes 96 %.

(b) **Pep** $^{\psi C}$: 3091.4 g/mol, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 1031.47

$t_R = 2.26$ min, ESI-MS (m/z): gef. 1031.31, Verschiebung zu $t_R = 2.36$ min nach Schaltung (pH 7.5).

(c) **Pep** $^{\psi C/N}$: 3091.4 g/mol, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 1031.47

$t_R = 2.00$ min, ESI-MS (m/z): gef. 1031.36, Verschiebung zu $t_R = 2.34$ min nach Schaltung (pH 7.5). Das Signal bei $t_R = 2.23$ min weist das m/z -Verhältnis auf 1031.29. Dieses m/z -Verhältnis und die Verschiebung der Retentionszeit weisen auf die Bildung des Zwischenproduktes mit einem geschalteten DEPSI-Segment hin. Das Peakflächenverhältnis des einfach geschalteten Produktes ($t_R = 2.23$ min) zu dem zweifach geschalteten ($t_R = 2.34$ min) beträgt 9/91 %.

(d) **Pep** GSP 3091.4 g/mol, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 1031.47

$t_R = 2.08$ min, ESI-MS (m/z): gef. 1031.72

(e) **Pep** GPP 3101.4g/mol, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 1034.81

$t_R = 2.49$ min, ESI-MS (m/z): gef. 1034.43

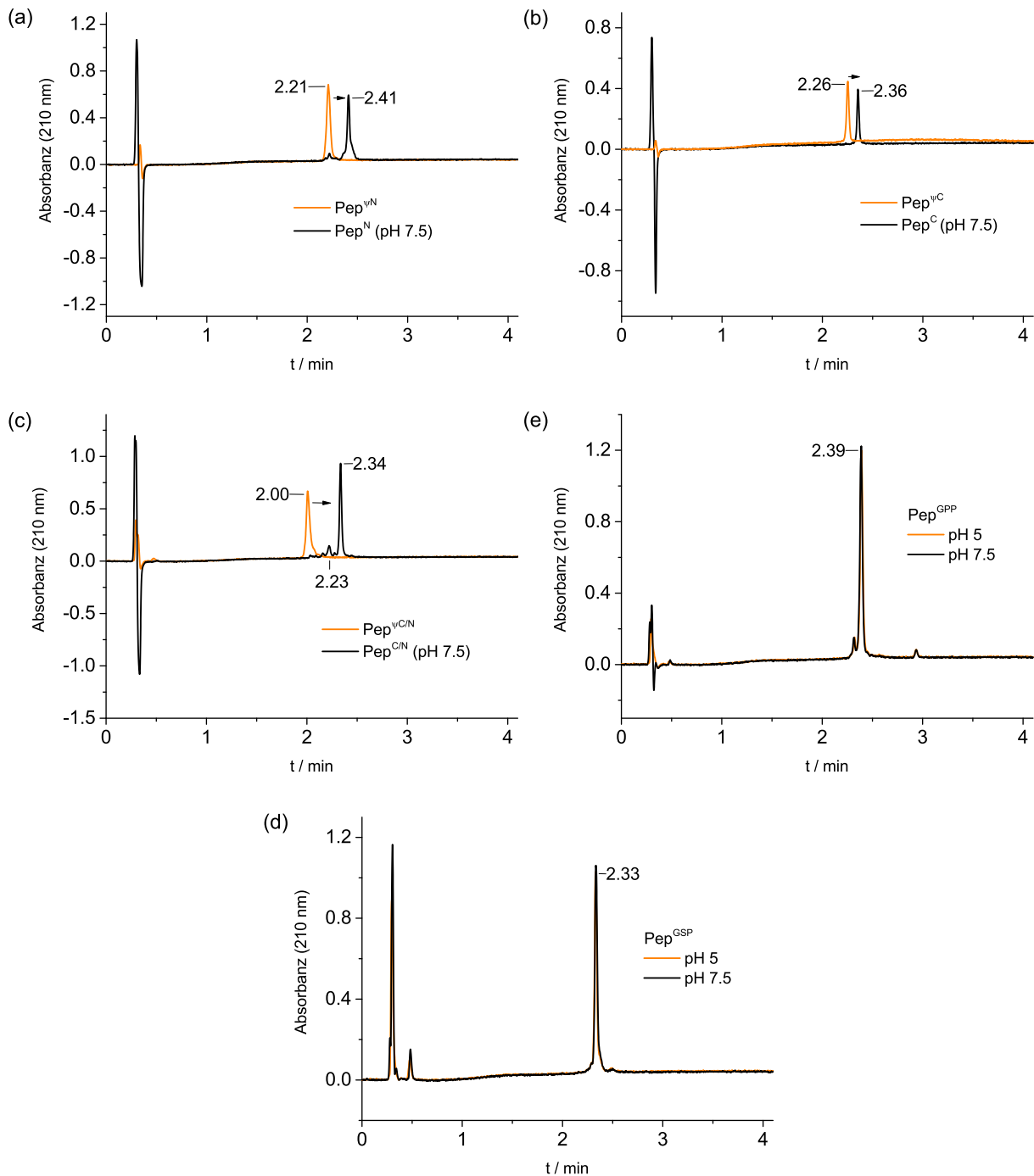


Abbildung 5.26. UPLC-MS Messungen zum Nachweis der Integrität sowie pH-Sensitivität der Schaltsegmente $\text{Pep}^{\psi C/N}$, $\text{Pep}^{\psi C}$ und $\text{Pep}^{\psi N}$, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen Pep^{GSP} und Pep^{GPP} . Alle Proben wurden in ACN/Wasser 1:10 (v/v) mit 0.1 % HCOOH ($\text{pH} < 5.5$) gelöst, mit einem Gradienten von 10 % B bis 60 % B, 4 min., 60 °C gemessen und bei 210 nm detektiert (orange). Anschließend wurden die Proben mit Phosphatpuffer auf pH 7.5 gebracht und unmittelbar erneut gemessen (schwarz). Die Schaltpeptide weisen im Gegensatz zu den Kontrollen eine Verschiebung der Retentionszeit auf, was sich auf die Änderung der Struktur der Schaltpeptide zurückführen lässt.

IR-Messungen

Die DEPSI-Estercarbonylbande bei 1779 cm^{-1} wurde vor und nach der Inkubation bei pH 7.5 betrachtet. Der *O-N*-Acyltransfer wurde durch eine Inkubation der Peptide in Na-Phosphatpuffer (pH 7.5) ausgelöst. Die geschalteten Peptide wurden anschließend gefriergetrocknet und im geschalteten Zustand gemessen.

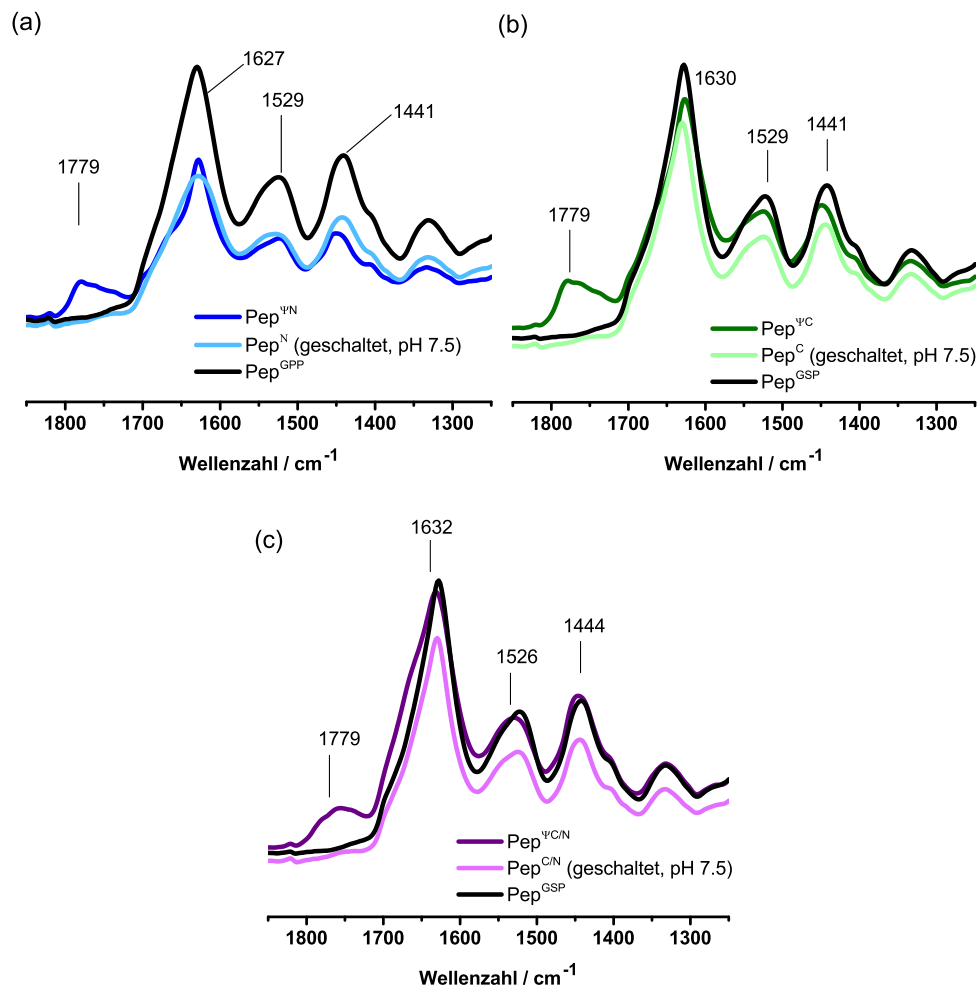


Abbildung 5.27. IR Messungen zum Nachweis der Integrität sowie pH-Sensitivität der Schalt-segmente $\text{Pep}^{\psi\text{C/N}}$, $\text{Pep}^{\psi\text{C}}$ und $\text{Pep}^{\psi\text{N}}$, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen Pep^{GSP} und Pep^{GPP} .

5.11 Synthese und Charakterisierung der wc2-Peptide

Tabelle 5.9. Übersicht der Peptide die eine wc2-Domäne enthalten.

Kürzel	Sequenz
Pep ^{ψN}	SWCGTTPG(ψ)SWCGT[GPP] ₆ GPP
Pep ^{$\psi C/N$}	SWCGTTPG(ψ)SWCGT[GPP] ₆ G(ψ)SP
Pep ^{ψC}	SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₆ G(ψ)SP
Pep ^{GSP}	SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₆ GSP
Pep ^{GPP}	SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₆ GPP
wc2-GPP ₇	SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₇ -NH ₂
wc2-[GPP] ₃	SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₃ -NH ₂
wc2-[GPP] ₅₀	SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₅₀
wc2-RDG	SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₇ GRGDSPG-NH ₂
wc2-RGD	SWCGTTPGSWCGT[GPP] ₇ GRDGSPG-NH ₂

5.11.1 Synthese von $\text{Pep}^{\psi N}$, $\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{GPP}$

Das Peptid $\text{Pep}^{\psi N}$ mit der Sequenz $\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{GPP}$ wurde entsprechend des allgemeinen Peptidsynthese Protokolls synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1). Als feste Phase wurde das mit Prolin vorbeladene 2-Chlortritylharz verwendet und, wie zuvor beschrieben, die Beladung während des ersten Kupplungsschritts reduziert. Das Schaltsegment $-\text{Gly}(\text{Boc})\text{Ser}-$ wurde wie in Sektion 5.3.6 beschrieben synthetisiert.

Charakterisierung von $\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{GPP}$

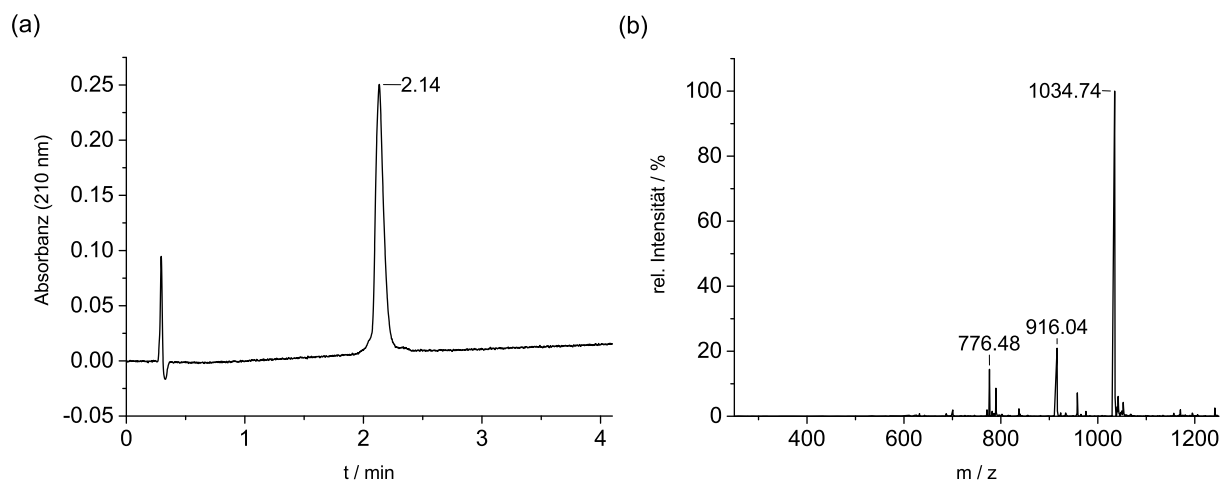


Abbildung 5.28. Charakterisierung von $\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{GPP}$, (a) UPLC (210 nm, 10 % B bis 30 % B, 4 min, 60 °C), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

$\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{GPP}$ $[\text{C}_{141}\text{H}_{198}\text{N}_{36}\text{O}_{40}\text{S}_2]$: 3101.4 g/mol, *UPLC* (210 nm): $t_R = 2.14$ min (20 % B bis 30 % B, 4 min, 60 °C), *ESI-MS* (m/z): $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 1034.81 gef. 1034.74, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ ber. 776.36 gef. 776.48; *HPLC* (210 nm): $t_R = 14.4$ min (10 % B bis 30 % B, 22 min, XBridge Säule, 60 °C).

5.11.2 Synthese von SWCGTTPGSWCGT-[GPP]₇

Das Peptid Pep^{GPP} mit der Sequenz SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇ wurde entsprechend des allgemeinen Peptidsynthese Protokolls synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1). Es erfolgte eine Einzelkupplung der Aminosäuren und ab der 15. Aminosäure wurde eine Doppelkupplung durchgeführt. Als feste Phase wurde das mit Prolin vorbeladene 2-Chlortritylharz verwendet und wie zuvor beschrieben die Beladung während des ersten Kupplungsschritts reduziert.

Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT-[GPP]₇

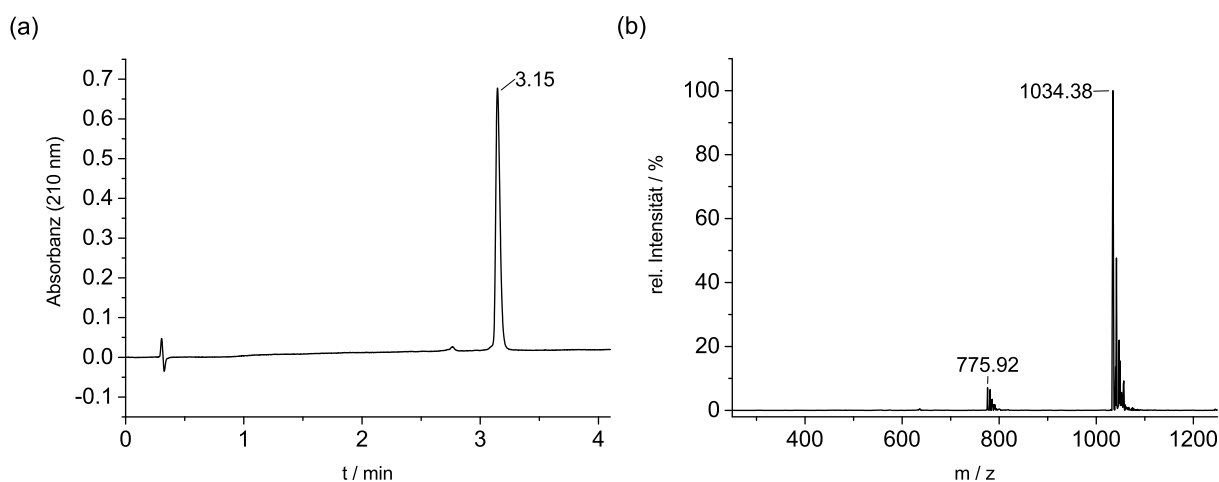


Abbildung 5.29. Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT-[GPP]₇, (a) UPLC (210 nm, 15 % B bis 30 % B, 4 min, 60 °C), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

SWCGTTPGSWCGT-[GPP]₇ [C₁₄₁H₁₉₈N₃₆O₄₀S₂]: 3101.44 g/mol, UPLC (210 nm): t_R = 3.15 min (15 % B bis 30 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): [M+3H]³⁺ ber. 1034.81 gef. 1034.38, [M+4H]⁴⁺ ber. 776.36 gef. 775.92; HPLC (210 nm): t_R = 21.08 min (10 % B bis 50 % B, 30 min, Synergy Säule).

5.11.3 Synthese von $\text{Pep}^{\psi C/N}$, $\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$

Das Peptid $\text{Pep}^{\psi C/N}$ mit der Sequenz $\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$ wurde entsprechend des allgemeinen Peptidsynthese Protokolls synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1). Als feste Phase wurde das mit Prolin vorbeladene 2-Chlortritylharz verwendet und die Beladung, wie zuvor beschrieben, während des ersten Kupplungsschritts reduziert. Die Schaltsegmente -Gly(Boc)Ser- wurden wie in Abschnitt 5.3.6 beschrieben synthetisiert.

Charakterisierung von $\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$

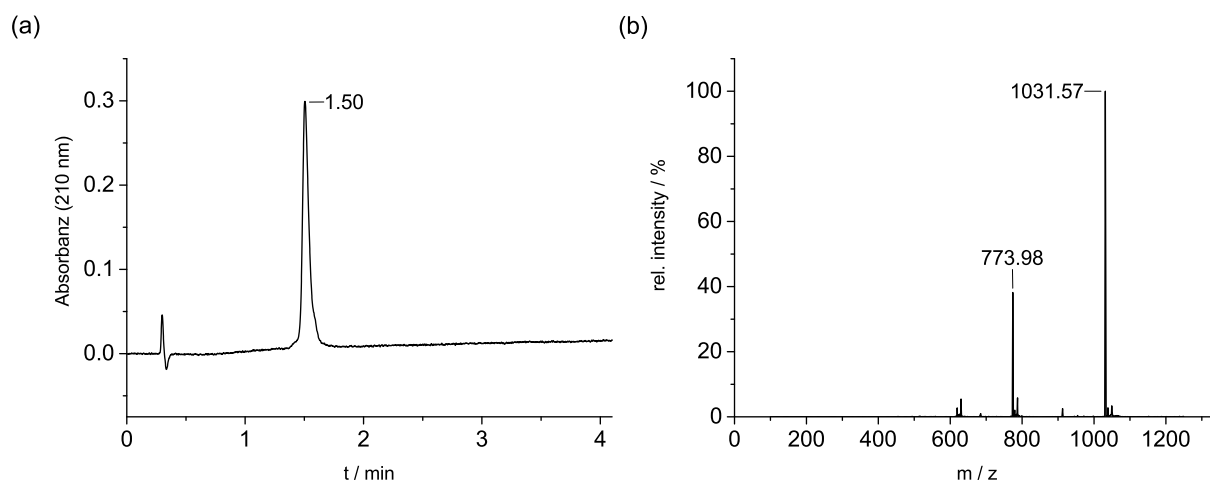


Abbildung 5.30. Charakterisierung von $\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$, (a) UPLC (210 nm, 15 % B bis 30 % B, 4 min, 60 °C), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

$\text{SWCGTTPG}(\psi)\text{SWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$ [$\text{C}_{139}\text{H}_{196}\text{N}_{36}\text{O}_{41}\text{S}_2$]: 3091.4 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 1.50$ min (20 % B bis 40 % B, 4 min, 60 °C), ESI-MS (m/z): $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 1031.47 gef. 1031.57, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ ber. 773.86 gef. 773.89; HPLC (210 nm): $t_R = 9.8$ min (15 % B bis 30 % B, 22 min, XBridge Säule, 60 °C).

5.11.4 Synthese von $\text{Pep}^{\psi C}$, $\text{SWCGTTPGSWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$

Das Peptid $\text{Pep}^{\psi C}$ mit der Sequenz $\text{SWCGTTPGSWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$ wurde entsprechend des Allgemeinen Peptidsynthese Protokolls Synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1). Als feste Phase wurde das mit Prolin vorbeladene 2-Chlortritylharz verwendet und wie zuvor beschrieben die Beladung während des ersten Kupplungsschritts reduziert. Das Schaltsegment $-\text{Gly}(\text{Boc})\text{Ser}-$ wurde wie in Sektion 5.3.6 beschrieben synthetisiert.

Charakterisierung von $\text{SWCGTTPGSWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$

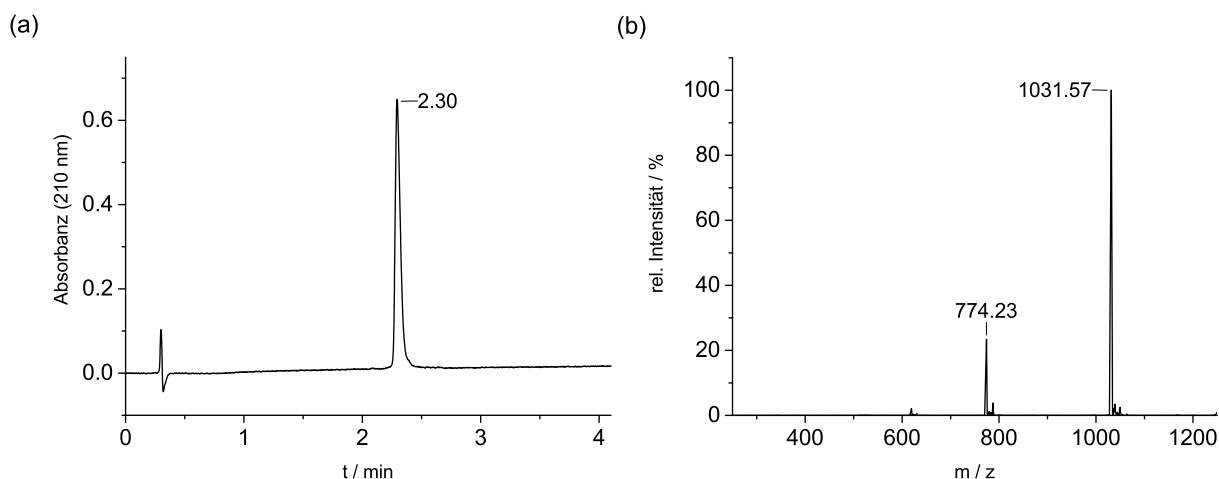


Abbildung 5.31. Charakterisierung von $\text{SWCGTTPGSWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$, (a) UPLC (210 nm, 10 % B bis 40 % B, 4 min, 60 °C), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

$\text{SWCGTTPGSWCGT}[\text{GPP}]_6\text{G}(\psi)\text{SP}$ $[\text{C}_{139}\text{H}_{196}\text{N}_{36}\text{O}_{41}\text{S}_2]$: 3091.4 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 2.30$ min (40 % B bis 60 % B, 4 min, 60 °C), ESI-MS (m/z): $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 1031.47 gef. 1031.57, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ ber. 773.86 gef. 774.23; HPLC (210 nm): $t_R = 11.2$ min (10 % B bis 40 % B, 11.2 min, XBridge Säule, 60 °C).

5.11.5 Synthese von Pep^{GSP} , $\text{SWCGTTPGSWCGT[GPP]}_6\text{GSP}$

Das Peptid Pep^{GSP} mit der Sequenz $\text{SWCGTTPGSWCGT[GPP]}_6\text{GSP}$ wurde entsprechend des Allgemeinen Peptidsynthese Protokolls synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1). Als feste Phase wurde das mit Prolin vorbeladene 2-Chlortritylharz verwendet und wie zuvor beschrieben die Beladung während des ersten Kupplungsschritts reduziert.

Charakterisierung von $\text{SWCGTTPGSWCGT[GPP]}_6\text{GSP}$

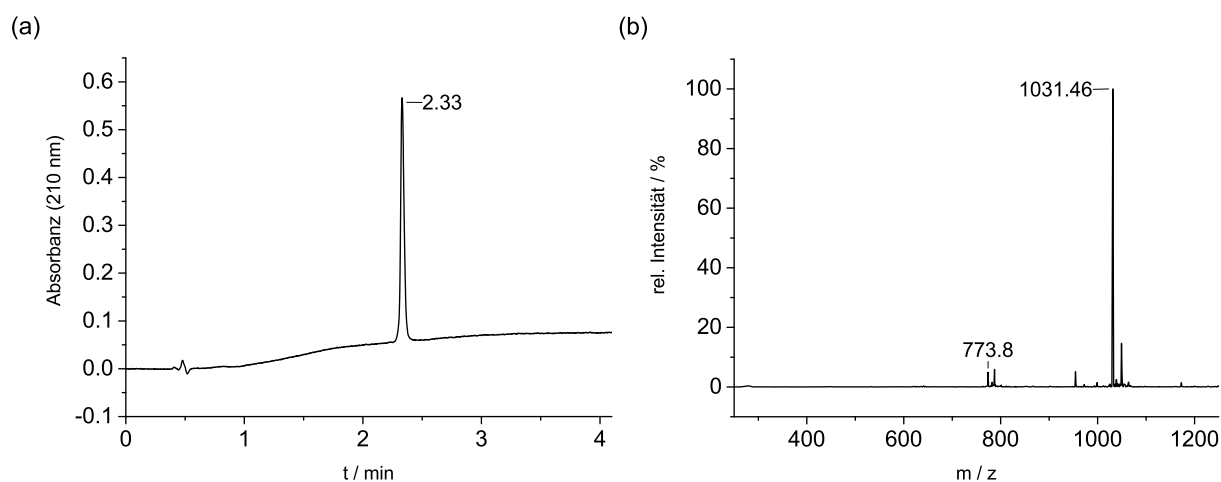


Abbildung 5.32. Charakterisierung von $\text{SWCGTTPGSWCGT[GPP]}_6\text{G}(\psi)\text{SP}$. (a) UPLC (210 nm, 10 % B bis 70 % B, 4 min, 60 °C) (b) ESI-MS des Produktpeaks.

$\text{SWCGTTPGSWCGT[GPP]}_6\text{G}(\psi)\text{SP}$ [$\text{C}_{139}\text{H}_{196}\text{N}_{36}\text{O}_{41}\text{S}_2$]: 3091.4 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 2.33$ min (10 % B bis 70 % B, 4 min, 60 °C), ESI-MS (m/z): $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ber. 1031.47 gef. 1031.46, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ ber. 773.86 gef. 774.38; HPLC (210 nm): $t_R = 8.4$ min (10 % B bis 70 % B, 22 min, XBridge Säule, 60 °C).

5.11.6 Synthese von wc2-[GPP]₃, SWCGTTPGSWCGT[GPP]₃-NH₂

Das Peptid wc2-[GPP]₃ mit der Sequenz SWCGTTPGSWCGT[GPP]₃ wurde entsprechend des allgemeinen Peptidsynthese Protokolls synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1). Es erfolgte eine Einzelkupplung der Aminosäuren und ab der 15. Aminosäure wurde eine Doppelkupplung durchgeführt. Als feste Phase wurde das Tentagel-SRAM Harz verwendet.

Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT[GPP]₃-NH₂

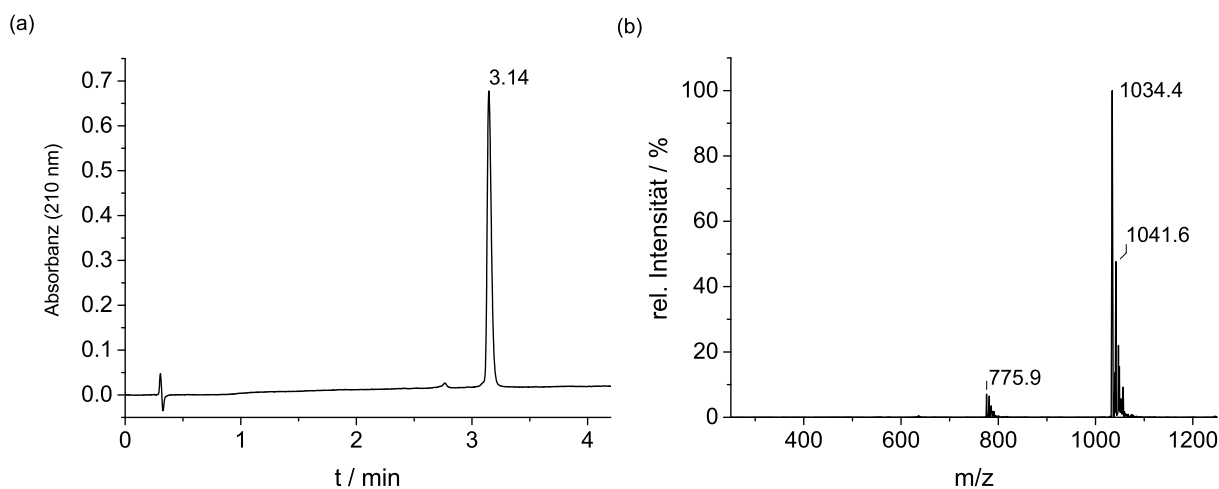


Abbildung 5.33. Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT[GPP]₃, (a) UPLC (210 nm, 20 % B bis 30 % B, 4 min, 60 °C), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

SWCGTTPGSWCGT[GPP]₃-NH₂ [C₉₃H₁₃₁N₂₅O₂₇S₂]: 2095.34 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 3.33$ min (10% B bis 30% B, 4 min), ESI-MS (m/z): [M+2H]²⁺ ber. 1048.68 gef. 1048.5; [M+3H]³⁺ ber. 699.45 gef. 699.4; [M+H+Na]⁺ ber. 1059.7 gef. 1059.8; HPLC (210 nm): $t_R = 23.3$ min (10% B bis 30% B, 30 min, SynergiTM Fusion-RP Säule). MALDI-ToF-MS (m/z): [M+Na]⁺ ber. 2116.9 gef. 2116.9, [M+K]⁺ ber. 2132.9 gef. 2132.9.

5.11.7 Synthese von wc2-[GPP]₇, SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇-NH₂

Das Peptid wc2-[GPP]₇ mit der Sequenz SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇-NH₂ wurde entsprechend des Allgemeinen Peptidsynthese Protokolls Synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1). Es erfolgte eine Einzelkupplung der Aminosäuren und ab der 15. Aminosäure wurde eine Doppelkupplung durchgeführt. Als feste Phase wurde das Tentagel-SRAM Harz verwendet.

Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇-NH₂

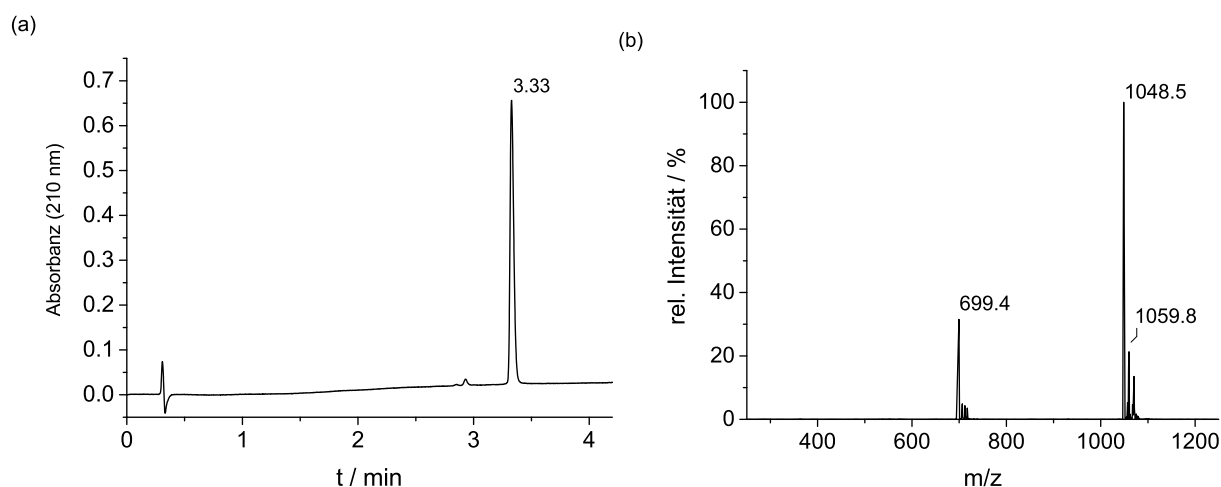


Abbildung 5.34. Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇, (a) UPLC (210 nm, 20 % B bis 30 % B, 4 min, 60 °C), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇-NH₂ [C₁₄₁H₁₉₉N₃₇O₃₉S₂]: 3100.5 g·mol⁻¹, UPLC (210 nm): t_R = 3.14 min (15 % B bis 30 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): [M+3H]³⁺ ber. 1034.5 gef. 1034.4, [M+4H]⁴⁺ ber. 776.13 gef. 775.9; HPLC (210 nm): t_R = 20.3 min (15% B bis 30% B, 30 min); MALDI-ToF-MS (m/z): [M+Na]⁺ ber. 3121.4 gef. 3121.6, [M+K]⁺ ber. 3137.4 gef. 3137.8.

5.11.8 Synthese von wc2-RDG,

SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRDGSPG-NH₂

Das Peptid wc2-RDG mit der Sequenz SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRDGSPG-NH₂ wurde entsprechend des Allgemeinen Peptidsynthese Protokolls Synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1). Es erfolgte eine Einzelkupplung der Aminosäuren und ab der 15. Aminosäure wurde eine Doppelkupplung durchgeführt. Als feste Phase wurde ein Tentagel-SRAM Harz mit einer Beladung von 0.24 mmol/g verwendet.

Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRDGSPG-NH₂

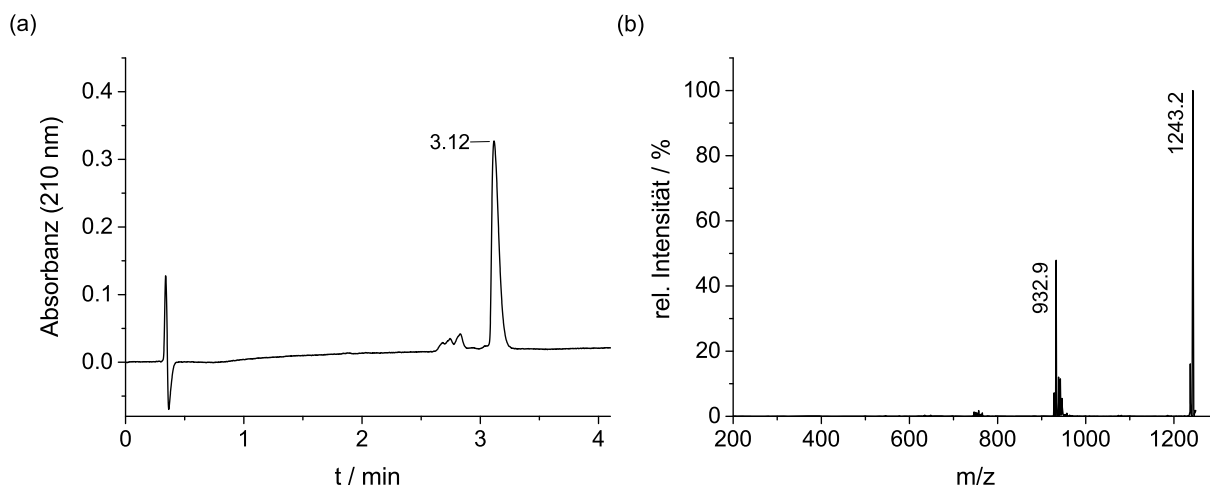


Abbildung 5.35. Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRDGSPG, (a) UPLC (210 nm, 15 % B bis 30 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRDGSPG-NH₂ [C₁₆₅H₂₃₇N₄₇O₄₉S₂]: 3727.12 g/mol, UPLC (210 nm): $t_R = 3.12$ min (15 % B bis 30 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): [M+3H]³⁺ ber. 1243.38 gef. 1243.2; [M+4H]⁴⁺ ber. 932.79 gef. 932.9. HPLC (210 nm): $t_R = 15.9$ min (15 % B bis 30 % B, 30 min). MALDI-ToF-MS (m/z): [M+H]⁺ ber. 3728.1 gef. 3727.6.

5.11.9 Synthese von wc2-RGD,

SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRGDSPG-NH₂

Das Peptid wc2-RGD mit der Sequenz SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRGDSPG-NH₂ wurde entsprechend des Allgemeinen Peptidsynthese Protokolls Synthetisiert (siehe Sektion 5.3.1). Als feste Phase wurde ein Tentagel-SRAM Harz mit einer Beladung von 0.24 mmol/g verwendet.

Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRGDSPG-NH₂

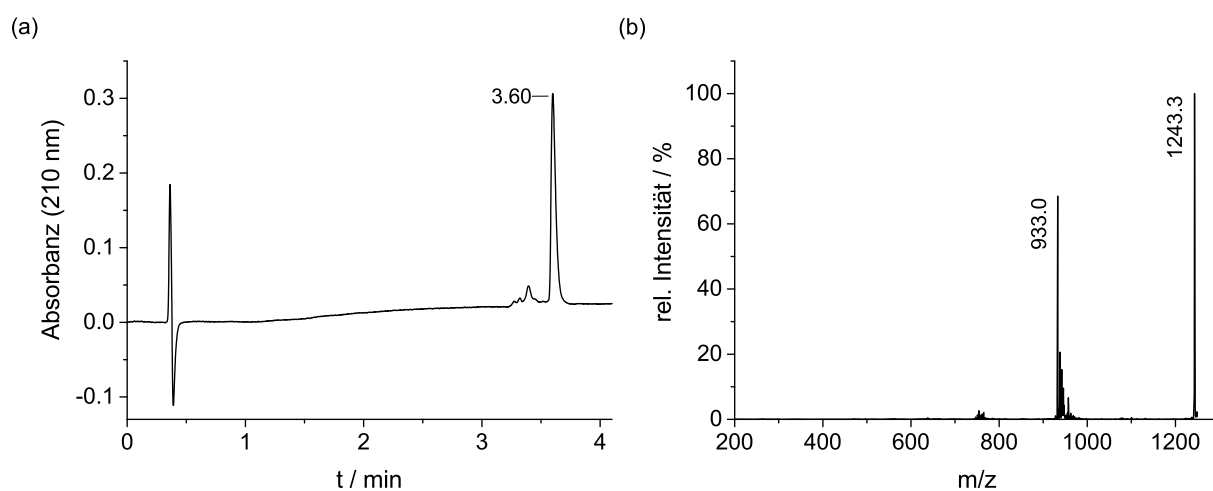


Abbildung 5.36. Charakterisierung von SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRGDSPG, (a) UPLC (210 nm, 15 % B bis 30 % B, 4 min), (b) ESI-MS des Produktpeaks.

SWCGTTPGSWCGT[GPP]₇GRDGSPG-NH₂ [C₁₆₅H₂₃₇N₄₇O₄₉S₂]: 3727.12 g/mol, UPLC (210 nm): t_R = 3.6 min. (10 % B bis 30 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): [M+3H]³⁺ ber. 1243.38 gef. 1243.3; [M+4H]⁴⁺ ber. 932.79 gef. 933.0. HPLC (210 nm): t_R = 15.9 min (15 % B bis 30 % B, 30 min). MALDI-TOF-MS (m/z): [M+H]⁺ ber. 3728.1 gef. 3726.1.

Es wurde der Ein- und Drei-Buchstaben-Code für Aminosäuren, empfohlen von der IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), benutzt (*Eur. J. Biochem.*, **1984**, 138, 9-37).

Literaturverzeichnis

- [1] D. Olsen, C. Yang, M. Bodo, R. Chang, S. Leigh, J. Baez, D. Carmichael, M. Perälä, E.-R. Hämäläinen, M. Jarvinen, J. Polarek, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1547–1567.
- [2] C. H. Lee, A. Singla, Y. Lee, *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, *221*, 1–22.
- [3] T. Luo, K. L. Kiick, *European Polymer Journal* **2013**, *49*, 2998–3009.
- [4] J. A. Fallas, L. E. R. O’Leary, J. D. Hartgerink, *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 3510–3527.
- [5] M. Sakaguchi, H. Hori, S. Hattori, S. Irie, A. Imai, M. Yanagida, H. Miyazawa, M. Toda, S. Inouye, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **1999**, *104*, 695–699.
- [6] L. Cooperman, D. Michaeli, *Journal of the American Academy of Dermatology* **1984**, *10*, 638–646.
- [7] A. K. Lynn, I. V. Yannas, W. Bonfield, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2004**, *71B*, 343–354.
- [8] S. Chattopadhyay, R. T. Raines, *Biopolymers* **2014**, *101*, 821–833.
- [9] S. Ricard-Blum, F. Ruggiero, M. van der Rest in *The Collagen Superfamily*, Vol. 247 (Eds.: J. Brinckmann, H. Notbohm, P. K. Müller), Springer Berlin Heidelberg, **2005**, book section 3, pp. 35–84.
- [10] Bornstei.P, *Annual Review of Biochemistry* **1974**, *43*, 567–603.
- [11] L. E. R. O’Leary, J. A. Fallas, E. L. Bakota, M. K. Kang, J. D. Hartgerink, *Nature Chemistry* **2011**, *3*, 821.
- [12] F. W. Kotch, R. T. Raines, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 3028–3033.
- [13] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1531–1546.
- [14] M. D. Shoulders, R. T. Raines in *Collagen Structure and Stability*, Vol. 78, Annual Reviews, Palo Alto, **2009**, pp. 929–958.
- [15] J. Brinckmann in *Collagens at a Glance* (Eds.: J. Brinckmann, H. Notbohm, P. K. Müller), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2005**, pp. 1–6.

- [16] D. E. Birk, J. M. Fitch, J. P. Babiarz, T. F. Linsenmayer, *The Journal of cell biology* **1988**, *106*, 999–1008.
- [17] R. Mayne, *Arthritis & Rheumatism* **1989**, *32*, 241–246.
- [18] G. N. Ramachandran, G. Kartha, *Nature* **1954**, *174*, 269–270.
- [19] G. N. Ramachandran, G. Kartha, *Nature* **1955**, *176*, 593.
- [20] W. T. Astbury, F. O. Bell, *Nature* **1940**, *145*, 421.
- [21] A. Rich, F. H. C. Crick, *Nature* **1955**, *176*, 915.
- [22] A. Rich, F. H. C. Crick, *Journal of Molecular Biology* **1961**, *3*, 483–IN4.
- [23] P. M. Cowan, S. McGavin, A. C. T. North, *Nature* **1955**, *176*, 1062.
- [24] P. Bruckner, M. van der Rest, *Microscopy Research and Technique* **1994**, *28*, 378–384.
- [25] D. Brazel, I. Oberbaumer, H. Dieringer, W. Babel, R. W. Glanville, R. Deutzmann, K. Kuhn, *European Journal of Biochemistry* **1987**, *168*, 529–536.
- [26] J. A. M. Ramshaw, N. K. Shah, B. Brodsky, *Journal of Structural Biology* **1998**, *122*, 86–91.
- [27] M. Goodman, W. Cai, G. A. Kinberger, *Macromolecular Symposia* **2003**, *201*, 223–236.
- [28] J. Bella, M. Eaton, B. Brodsky, H. Berman, *Science* **1994**, *266*, 75–81.
- [29] K. Okuyama, X. Xu, M. Iguchi, K. Noguchi, *Peptide Science* **2006**, *84*, 181–191.
- [30] R. Z. Kramer, J. Bella, B. Brodsky, H. M. Berman, *Journal of Molecular Biology* **2001**, *311*, 131–147.
- [31] R. Z. Kramer, J. Bella, P. Mayville, B. Brodsky, H. M. Berman, *Nature Structural Biology* **1999**, *6*, 454.
- [32] V. Nagarajan, S. Kamitori, K. Okuyama, *The Journal of Biochemistry* **1998**, *124*, 1117–1123.
- [33] V. Nagarajan, S. Kamitori, K. Okuyama, *The Journal of Biochemistry* **1999**, *125*, 310–318.
- [34] R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella, A. Zagari, *Protein Science* **2002**, *11*, 262–270.
- [35] M. A. Schumacher, K. Mizuno, H. P. Bachinger, *J Biol Chem* **2006**, *281*, 27566–74.
- [36] C. L. Jenkins, M. M. Vasbinder, S. J. Miller, R. T. Raines, *Organic Letters* **2005**, *7*, 2619–2622.
- [37] O. P. Boryskina, T. V. Bolbukh, M. A. Semenov, A. I. Gasan, V. Y. Maleev, *Journal of Molecular Structure* **2007**, *827*, 1–10.

- [38] D. Cram, *Science* **1988**, *240*, 760–767.
- [39] L. E. Bretscher, C. L. Jenkins, K. M. Taylor, M. L. DeRider, R. T. Raines, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 777–778.
- [40] M. L. DeRider, S. J. Wilkens, M. J. Waddell, L. E. Bretscher, F. Weinhold, R. T. Raines, J. L. Markley, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 2497–2505.
- [41] S. K. Holmgren, K. M. Taylor, L. E. Bretscher, R. T. Raines, *Nature* **1998**, *392*, 666–667.
- [42] S. K. Holmgren, L. E. Bretscher, K. M. Taylor, R. T. Raines, *Chemistry and Biology* **1999**, *6*, 63–70.
- [43] M. D. Shoulders, J. A. Hodges, R. T. Raines, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 8112–8113.
- [44] R. S. Erdmann, H. Wennemers, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 6835–6838.
- [45] H. P. Bächinger, K. Mizuno, J. A. Vranka, S. P. Boudko in *5.16 - Collagen Formation and Structure*, Elsevier, Oxford, **2010**, pp. 469–530.
- [46] G. B. Fields, D. J. Prockop, *Biopolymers* **1996**, *40*, 345–57.
- [47] K. Sutoh, H. Noda, *Biopolymers* **1974**, *13*, 2477–2488.
- [48] A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, B. Brodsky, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14960–14967.
- [49] R. Z. Kramer, M. G. Venugopal, J. Bella, P. Mayville, B. Brodsky, H. M. Berman, *Journal of Molecular Biology* **2000**, *301*, 1191–1205.
- [50] A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, B. Brodsky, *Journal of Molecular Biology* **2002**, *316*, 385–394.
- [51] A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, B. Brodsky, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 19343–19349.
- [52] V. Gauba, J. D. Hartgerink, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 2683–2690.
- [53] S. Rele, Y. Song, R. P. Apkarian, Z. Qu, V. P. Conticello, E. L. Chaikof, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 14780–14787.
- [54] A. A. Jalan, K. A. Jochim, J. D. Hartgerink, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 7535–7538.

- [55] I. C. Tanrikulu, A. Forticaux, S. Jin, R. T. Raines, *Nat Chem* **2016**, *8*, 1008–1014.
- [56] M. A. Cejas, W. A. Kinney, C. Chen, J. G. Vinter, H. R. Almond, K. M. Balss, C. A. Maryanoff, U. Schmidt, M. Breslav, A. Mahan, E. Lacy, B. E. Maryanoff, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 8513–8518.
- [57] M. A. Cejas, W. A. Kinney, C. Chen, G. C. Leo, B. A. Tounge, J. G. Vinter, P. P. Joshi, B. E. Maryanoff, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 2202–2203.
- [58] M. A. Cejas, W. A. Kinney, C. Chen, G. C. Leo, B. A. Tounge, J. G. Vinter, P. P. Joshi, B. E. Maryanoff, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 2202–2203.
- [59] C. Boulègue, H.-J. Musiol, M. G. Götz, C. Renner, L. Moroder, *Antioxidants and Redox Signaling* **2007**, *10*, 113–126.
- [60] A. Lesage, F. Penin, C. Geourjon, D. Marion, M. van der Rest, *Biochemistry* **1996**, *35*, 9647–9660.
- [61] E. Chung, E. M. Keele, E. J. Miller, *Biochemistry* **1974**, *13*, 3459–3464.
- [62] H. P. Bächinger, P. Bruckner, R. Timpl, D. J. Prockop, J. Engel, *European Journal of Biochemistry* **1980**, *106*, 619–632.
- [63] D. Barth, O. Kyrieleis, S. Frank, C. Renner, L. Moroder, *Chemistry – A European Journal* **2003**, *9*, 3703–3714.
- [64] O. D. Krishna, K. L. Kiick, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2626–2631.
- [65] D. E. Mechling, H. P. Bachinger, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 14532–14536.
- [66] B. Sacca, S. Fiori, L. Moroder, *Biochemistry* **2003**, *42*, 3429–3436.
- [67] J. C. D. Müller, J. Ottl, L. Moroder, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5111–5116.
- [68] D. Barth, H. J. Musiol, M. Schutt, S. Fiori, A. G. Milbradt, C. Renner, L. Moroder, *Chemistry* **2003**, *9*, 3692–702.
- [69] J. Ottl, R. Battistuta, M. Pieper, H. Tschesche, W. Bode, K. Kuhn, L. Moroder, *FEBS Lett* **1996**, *398*, 31–6.
- [70] J. Ottl, L. Moroder, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 653–661.
- [71] J. Ottl, D. Gabriel, G. Murphy, V. Knäuper, Y. Tominaga, H. Nagase, M. Kröger, H. Tschesche, W. Bode, L. Moroder, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 119–132.
- [72] T. Koide, D. L. Homma, S. Asada, K. Kitagawa, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 5230–5233.

- [73] C. M. Yamazaki, S. Asada, K. Kitagawa, T. Koide, *Peptide Science* **2008**, *90*, 816–823.
- [74] S. Frank, S. Boudko, K. Mizuno, T. Schulthess, J. Engel, H. P. Bachinger, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 7747–7750.
- [75] C. G. Fields, C. M. Lovdahl, A. J. Miles, V. L. M. Hageini, G. B. Fields, *Biopolymers* **1993**, *33*, 1695–1707.
- [76] S. Thakur, D. Vadolas, H. P. Germann, E. Heidemann, *Biopolymers* **1986**, *25*, 1081–6.
- [77] H. P. Germann, E. Heidemann, *Biopolymers* **1988**, *27*, 157–63.
- [78] C. G. Fields, B. Grab, J. L. Lauer, A. J. Miles, Y.-C. Yu, G. B. Fields, *Letters in Peptide Science* **1996**, *3*, 3–16.
- [79] M. J. Barnes, C. G. Knight, R. W. Farndale, *Biopolymers* **1996**, *40*, 383–397.
- [80] L. F. Morton, A. R. Peachey, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 11044–11048.
- [81] Y. Tanaka, K. Suzuki, T. Tanaka, *J Pept Res* **1998**, *51*, 413–9.
- [82] S. T. Khew, Y. W. Tong, *Biochemistry* **2007**, *47*, 585–596.
- [83] C. G. Fields, D. J. Mickelson, S. L. Drake, J. B. McCarthy, G. B. Fields, *J Biol Chem* **1993**, *268*, 14153–60.
- [84] T. Koide, M. Yuguchi, M. Kawakita, H. Konno, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 9388–9389.
- [85] M. Goodman, Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 5156–5157.
- [86] M. Goodman, G. Melacini, Y. Feng, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 10928–10929.
- [87] J. Kwak, A. D. Capua, E. Locardi, M. Goodman, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14085–14091.
- [88] E. T. Rump, D. T. S. Rijkers, H. W. Hilbers, P. G. de Groot, R. M. J. Liskamp, *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8*, 4613–4621.
- [89] H. Hojo, Y. Akamatsu, K. Yamauchi, M. Kinoshita, S. Miki, Y. Nakamura, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14263–14274.
- [90] Y. Feng, G. Melacini, M. Goodman, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8716–8724.

- [91] Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 10351–10358.
- [92] W. Cai, D. Wong, G. A. Kinberger, S. W. Kwok, J. P. Taulane, M. Goodman, *Bioorganic Chemistry* **2007**, *35*, 327–337.
- [93] J.-C. Horng, A. J. Hawk, Q. Zhao, E. S. Benedict, S. D. Burke, R. T. Raines, *Organic Letters* **2006**, *8*, 4735–4738.
- [94] J. Brask, K. J. Jensen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 697–700.
- [95] P. W. Thulstrup, J. Brask, K. J. Jensen, E. Larsen, *Biopolymers* **2005**, *78*, 46–52.
- [96] W. Cai, S. W. Kwok, J. P. Taulane, M. Goodman, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15030–15031.
- [97] M. M. Pires, J. Chmielewski, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 2706–2712.
- [98] G. A. Kinberger, J. P. Taulane, M. Goodman, *Inorganic Chemistry* **2006**, *45*, 961–963.
- [99] C. Byrne, P. A. McEwan, J. Emsley, P. M. Fischer, W. C. Chan, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 2589–2591.
- [100] R. S. Erdmann, H. Wennemers, *Organic and Biomolecular Chemistry* **2012**, *10*, 1982–1986.
- [101] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. van Hest, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 8806–27.
- [102] U. Kusebauch, S. A. Cadamuro, H.-J. Musiol, M. O. Lenz, J. Wachtveitl, L. Moroder, C. Renner, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 7015–7018.
- [103] U. Kusebauch, S. Cadamuro, H.-J. Musiol, L. Moroder, C. Renner, *Chemistry – A European Journal* **2007**, *13*, 2966–2973.
- [104] Y. Li, C. A. Foss, D. D. Summerfield, J. J. Doyle, C. M. Torok, H. C. Dietz, M. G. Pomper, S. M. Yu, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 14767–72.
- [105] A. M. Acevedo-Jake, D. H. Ngo, J. D. Hartgerink, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1157–1161.
- [106] S.-G. Lee, Y. Lee Jee, J. Chmielewski, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 8429–8432.
- [107] L. Chen, S. Cai, J. Lim, S. S. Lee, S.-G. Lee, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 407–410.

- [108] C. Siebler, R. S. Erdmann, H. Wennemers, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 10340–10344.
- [109] T. Haack, M. Mutter, *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 1589–1592.
- [110] M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wöhr, *Pept Res* **1995**, *8*, 145–53.
- [111] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 9218–9227.
- [112] P. White, J. W. Keyte, K. Bailey, G. Bloomberg, *Journal of Peptide Science* **2004**, *10*, 18–26.
- [113] Y. Sohma, T. Yoshiya, A. Taniguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Peptide Science* **2007**, *88*, 253–262.
- [114] T. Yoshiya, A. Taniguchi, Y. Sohma, F. Fukao, S. Nakamura, N. Abe, N. Ito, M. Skwarczynski, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5*, 1720–1730.
- [115] S. V. Filip, F. Cavelier, *Journal of Peptide Science* **2004**, *10*, 115–118.
- [116] J. Hentschel, E. Krause, H. G. Börner, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 7722–7723.
- [117] M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Dos Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucedo, G. Tuchscherer, *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 4172–4178.
- [118] L. A. Carpino, E. Krause, C. D. Sferdean, M. Schümann, H. Fabian, M. Bienert, M. Beyer-mann, *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 7519–7523.
- [119] A. Taniguchi, Y. Sohma, M. Kimura, T. Okada, K. Ikeda, Y. Hayashi, T. Kimura, S. Hirota, K. Matsuzaki, Y. Kiso, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *128*, 696–697.
- [120] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1953**, *583*, 129–149.
- [121] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [122] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 6640–6646.
- [123] S. Tsuda, T. Yoshiya, M. Mochizuki, Y. Nishiuchi, *Organic Letters* **2015**, *17*, 1806–1809.

- [124] S. S. Kulkarni, J. Sayers, B. Premdjee, R. J. Payne, *Nature Reviews Chemistry* **2018**, *2*, 0122.
- [125] S. E. Paramonov, V. Gauba, J. D. Hartgerink, *Macromolecules* **2005**, *38*, 7555–7561.
- [126] G. T. Hermanson in *Chapter 3 - The Reactions of Bioconjugation* (Ed.: G. T. Hermanson), Academic Press, Boston, **2013**, pp. 229–258.
- [127] G. T. Hermanson in *Chapter 19 - Vaccines and Immunogen Conjugates* (Ed.: G. T. Hermanson), Academic Press, Boston, **2013**, pp. 839–865.
- [128] M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1989**, *28*, 535–554.
- [129] Y. Li, X. Mo, D. Kim, S. M. Yu, *Biopolymers* **2011**, *95*, 94–104.
- [130] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 4325–4329.
- [131] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10068–73.
- [132] H. Rohde, J. Schmalisch, Z. Harpaz, F. Diezmann, O. Seitz, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1396–1400.
- [133] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, *46*, 9248–52.
- [134] R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 3551–3554.
- [135] C. G. Long, E. Braswell, D. Zhu, J. Apigo, J. Baum, B. Brodsky, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11688–11695.
- [136] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 526–533.
- [137] Y. Sohma, H. Kitamura, H. Kawashima, H. Hojo, M. Yamashita, K. Akaji, Y. Kiso, *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 7146–7148.
- [138] N. J. Greenfield, *Nat. Protocols* **2007**, *1*, 2876–2890.
- [139] J. L. S. Lopes, A. J. Miles, L. Whitmore, B. A. Wallace, *Protein Science* **2014**, *23*, 1765–1772.
- [140] N. Sreerama, R. W. Woody in *Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra, Vol. 383*, Academic Press, **2004**, pp. 318–351.

- [141] F. W. Kotch, I. A. Guzei, R. T. Raines, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 2952–2953.
- [142] S. A. Cadamuro, R. Reichold, U. Kusebauch, H. J. Musiol, C. Renner, P. Tavan, L. Moroder, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 2143–6.
- [143] M. D. Shoulders, I. A. Guzei, R. T. Raines, *Biopolymers* **2008**, *89*, 443–454.
- [144] A. Bachmann, T. Kiefhaber, S. Boudko, J. Engel, H. P. Bachinger, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 13897–13902.
- [145] J. D. Bryngelson, J. N. Onuchic, N. D. Socci, P. G. Wolynes, *Proteins: Structure Function and Bioinformatics* **1995**, *21*, 167–195.
- [146] H. Bentz, H. P. Bachinger, R. Glanville, K. Kuhn, *European Journal of Biochemistry* **1978**, *92*, 563–567.
- [147] N. J. Greenfield, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2527–2535.
- [148] Y. Kobayashi, R. Sakai, K. Kakiuchi, T. Isemura, *Biopolymers* **1970**, *9*, 415–425.
- [149] I. Coin, R. Dölling, E. Krause, M. Bienert, M. Beyermann, C. D. Sferdean, L. A. Carpino, *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 6171–6177.
- [150] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics, Int. Vers.*, CRC Press, Boca Raton, FL, **2005**.
- [151] D. Luo, S. W. Smith, B. D. Anderson, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *94*, 304–316.
- [152] S. García-Santamarina, S. Boronat, E. Hidalgo, *Biochemistry* **2014**, *53*, 2560–2580.
- [153] S. P. Boudko, J. Engel, *Journal of Molecular Biology* **2004**, *335*, 1289–1297.
- [154] S. P. Boudko, J. Engel, K. Okuyama, K. Mizuno, H. P. Bächinger, M. A. Schumacher, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 32580–32589.
- [155] R. J. Radmer, T. E. Klein, *Biophysical Journal* **2006**, *90*, 578–588.
- [156] H. Vissing, M. D’Alessio, B. Lee, F. Ramirez, M. Godfrey, D. W. Hollister, *J Biol Chem* **1989**, *264*, 18265–7.
- [157] J. Engel, H.-T. Chen, D. J. Prockop, H. Klump, *Biopolymers* **1977**, *16*, 601–622.
- [158] A. V. Persikov, Y. Xu, B. Brodsky, *Protein Science* **2004**, *13*, 893–902.
- [159] A. V. Golser, *Dissertation, Neue Ansätze zur Produktion Kollagen-basierter Biomaterialien*, **2019**.

- [160] A. Golser, T. Scheibel, *RSC Advances* **2017**, 7, 38273–38278.
- [161] A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, B. Brodsky, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 11500–11501.
- [162] R. Z. Kramer, L. Vitagliano, J. Bella, R. Berisio, L. Mazzarella, B. Brodsky, A. Zagari, H. M. Berman, *Journal of Molecular Biology* **1998**, 280, 623–638.
- [163] A. Bhattacharjee, M. Bansal, *IUBMB Life* **2005**, 57, 161–172.
- [164] S.-W. Chang, M. J. Buehler, *Materials Today* **2014**, 17, 70–76.
- [165] Y. Li, S. M. Yu, *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, 17, 968–975.
- [166] J.-D. Malcor, D. Bax, S. W. Hamaia, N. Davidenko, S. M. Best, R. E. Cameron, R. W. Farndale, D. Bihan, *Biomaterials* **2016**, 85, 65–77.
- [167] X. Jiang, S. H. Lim, H.-Q. Mao, S. Y. Chew, *Experimental Neurology* **2010**, 223, 86–101.
- [168] L. Sandrin, D. Thakar, C. Goyer, P. Labbé, D. Boturyn, L. Coche-Guérente, *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, 3, 5577–5587.
- [169] C. S. Elangbam, J. Qualls, C. W., R. R. Dahlgren, *Vet Pathol* **1997**, 34, 61–73.
- [170] S. Wohlrab, S. Müller, A. Schmidt, S. Neubauer, H. Kessler, A. Leal-Egaña, T. Scheibel, *Biomaterials* **2012**, 33, 6650–6659.
- [171] T. R. Butt, S. C. Edavettal, J. P. Hall, M. R. Mattern, *Protein Expression and Purification* **2005**, 43, 1–9.
- [172] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, 65, 4900–4908.
- [173] O. F. Luna, J. Gomez, C. Cardenas, F. Albericio, S. H. Marshall, F. Guzman, *Molecules* **2016**, 21, 1542.

Anhang

5.12 CD-Spektren

CD-Spektren der wc2-Peptide

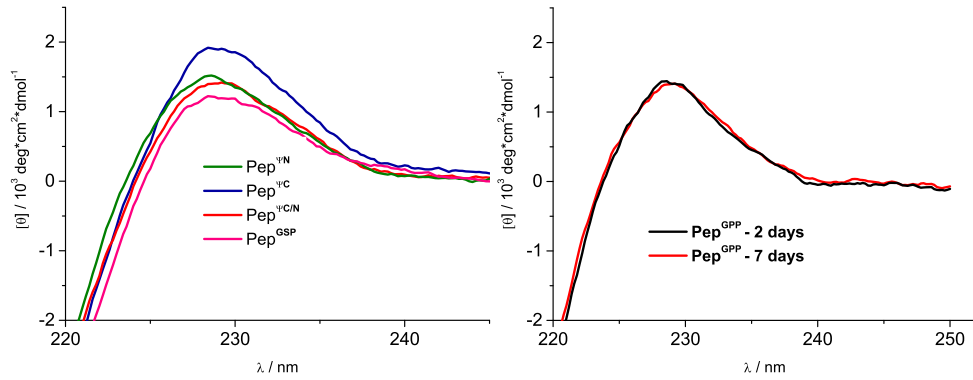


Abbildung 5.37. CD-Spektren der wc2-Peptide $\text{Pep}^{\psi N}$, $\text{Pep}^{\psi C}$, $\text{Pep}^{\psi C/N}$, Pep^{GSP} nach 2 Tagen Equilibrierung (links) und der Kontrolle Pep^{GPP} nach 2 und 7 Tagen Äquilibration (rechts).

CD-Spektren der wc2-Peptid Titrationsexperimente

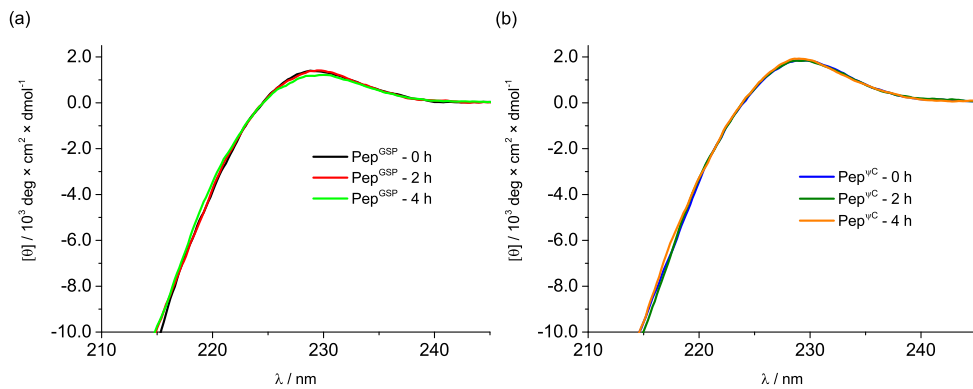


Abbildung 5.38. CD-Spektren der Titrationsexperimente von Pep^{GSP} (a) und $\text{Pep}^{\psi C}$ (b), jeweils unmittelbar nach pH-Titration von pH 5 auf pH 7.4 (0 h), als auch nach 2 h und 4 h Äquilibration.

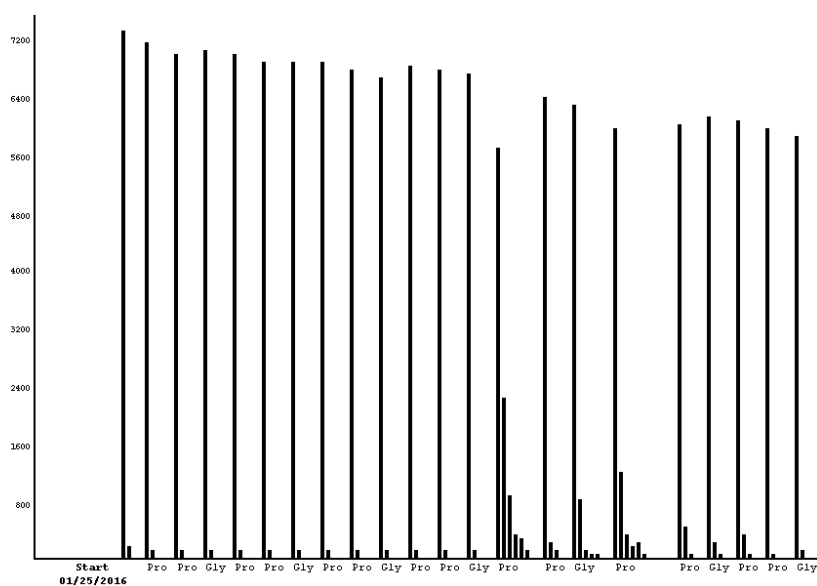


Abbildung 5.39. Problematik der $[GPP]_x$ Synthese, visualisiert durch Fmoc-Abspaltungsprotokoll am Beispiel der Synthese von $[GPP]_7$ an einem Tentagel® S RAM Harz (UV-Vis Detektor, 301 nm, detektiert wird das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt).¹⁷³ Bei Kuppelung der 13. Aminosäure erfolgt mehrmalige Wiederholung des Fmoc-Abspaltungsprotokolls, was darauf hindeutet, dass ab dieser Aminosäure eine Peptidlänge erreicht wurde, bei der vermutlich eine verstärkte Peptid-Peptid-Wechselwirkung oder Peptid-Faltung auftritt, wodurch der Zugang zum *N*-Terminus erschwert wird.

Selbstständigkeitserklärung

„Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 42/2018 am 11.07.2018 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.“

Berlin, 20. November 2019

Matthias Röber